



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

진골, 제주조릿대 및 미역의 성분  
동정 및 생리활성 연구

濟州大學校 大學院

化學科

高 僖 徹

2010年 08月



博士學位論文

진균, 제주조릿대 및 미역쇠 성분  
동정 및 생리활성 연구

濟州大學校 大學院

1952  
化學科

高 僖 徹

2010年 08月

# 진균, 제주조릿대 및 미역의 성분 동정 및 생리활성 연구

指導教授 姜 昌 禧

高 僖 徹

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2010 年 8 月

高僖徹의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_  
委 員 \_\_\_\_\_

濟州大學校 大學院

2010 年 8 月

Identification and Biological activities  
of Phytochemicals Isolated from *Citrus sunki*,  
*Sasa quepaertensis*, and *Petalonia binghamiae*

Hee-Chul Ko

(Supervised by professor Chang-Hee Kang)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2010. 8.

This dissertation has been examined and approved.

Commitee Chairman, Nam Ho Lee

Dissertation Committee, Se Jae Kim

Dissertation Committee, Duk Sang Jung

Dissertation Committee, Woo Song Lee

Dissertation Committee, Chang Hee Kang

DEPARTMENT of CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

<b>LIST OF TABLES</b> .....	iii
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>I. 서 론</b> .....	1
<b>II. 결과 및 고찰</b> .....	7
<b>Part II-1. 진굴 분리 PMFs 조성물(PRF)과 PMFs의 생리활성</b> .....	7
1. 이론적 고찰 .....	7
2. 재료 및 방법 .....	12
2-1. 재료 및 사용기기 .....	12
2-2. 시료의 분석 및 분리 .....	13
2-3. 생리활성 평가 .....	16
3. 결 과 .....	20
3-1. PRF의 제조 및 함량분석 .....	20
3-2. PRF 중의 PMFs 분리 .....	27
3-3. PMFs의 화학구조 확인 .....	28
3-4. DPPH 라디칼 소거 활성 .....	43
3-5. NO 생성 저해 활성 .....	43
4. 고 찰 .....	54
<b>Part II-2. 제주 조릿대 유효성분 분리 및 생리활성</b> .....	60
1. 이론적 고찰 .....	60
2. 재료 및 방법 .....	63
2-1. 재료 및 사용기기 .....	63

2-2. 활성물질의 분리 .....	64
2-3. 생리활성 평가 .....	68
3 결 과 .....	71
3-1. 추출 및 분획 .....	71
3-2. 화합물의 구조 결정 .....	75
3-3. DPPH 라디칼 소거 활성 .....	94
3-4. NO 생성 저해 활성 .....	94
4 고 찰 .....	102
<b>Part II-3. 미역쇠 분리 카로테노이드류의 생리활성 .....</b>	<b>104</b>
1. 이론적 고찰 .....	104
2. 재료 및 방법 .....	106
2-1. 재료 및 사용기기 .....	106
2-2. 화합물의 분리 .....	107
2-3. 생리활성 평가 .....	108
3. 결 과 .....	111
3-1. 화합물의 분리 및 구조 결정 .....	111
3-2. DPPH 라디칼 소거 활성 .....	116
3-3. NO 생성 저해 활성 .....	116
4. 고 찰 .....	118
<b>III. 연구 요약 .....</b>	<b>120</b>
<b>IV. 참고 문헌 .....</b>	<b>122</b>



## LIST OF TABLES

Table 1-1. Gradient elution condition for HPLC separation .....	15
Table 1-2. Linear regression results of standard calibration curves using nine flavonoid standards .....	15
Table 1-3. Gradient elution condition for prep-LC separation .....	16
Table 1-4. Flavonoid contents extracted by n-hexane, CHCl <sub>3</sub> , EtOAc, n-BuOH and hot water .....	26
Table 1-5. <sup>1</sup> H NMR chemical shifts of eight PMFs (CDCl <sub>3</sub> , δ ppm) .....	41
Table 1-6. <sup>13</sup> C NMR spectra data for eight PMFs (CDCl <sub>3</sub> , δ ppm) .....	42
Table 2-1. Gradient elution condition for prep-LC separation .....	65
Table 2-2. Gradient elution condition of CHCl <sub>3</sub> and EtOAc fractions for prep-LC separation .....	67
Table 2-3. Gradient elution condition of n-BuOH fraction for prep-LC separation .....	67
Table 2-4. <sup>13</sup> C NMR spectrum data of phytochemicals isolated from <i>S. quelpaertensis</i> (δ, ppm) .....	92
Table 3-1. HPLC isolation condition of <i>P. binghamiae</i> extract .....	108
Table 3-2. <sup>13</sup> C-NMR spectrum data for PB-001 and PB-002 in CD <sub>3</sub> OD .....	115

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. The relationship between the free radicals and antioxidant in the human body .....	2
Fig. 2. Absorbance change at 517 nm caused by the reaction of anti-oxidants with the free radical of DPPH .....	4
Fig. 3. NO production and inflammation reaction in RAW 264.7 cells .....	6
Fig. 1-1. Chemical structures of typical plant flavonoids .....	8
Fig. 1-2. Chemical structure of citrus flavonoids .....	9
Fig. 1-3. Photograph of <i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka .....	12
Fig. 1-4. HPLC chromatogram of flavonoid standards .....	22
Fig. 1-5. HPLC chromatogram of hot water extraction .....	23
Fig. 1-6. HPLC chromatogram of hexane fraction(PRF) .....	23
Fig. 1-7. HPLC chromatogram of CHCl <sub>3</sub> fraction .....	24
Fig. 1-8. HPLC chromatogram of EtOAc fraction .....	24
Fig. 1-9. HPLC chromatogram of n-BuOH fraction .....	25
Fig. 1-10. Schematic diagram for isolation of eight PMFs .....	27
Fig. 1-11. Chemical structure of PMFs deduced from <sup>1</sup> H-NMR and <sup>13</sup> C-NMR spectrometry .....	29
Fig. 1-12. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 1 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	32
Fig. 1-13. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 1 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	32
Fig. 1-14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 2 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	33
Fig. 1-15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 2 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	33
Fig. 1-16. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 3 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	34
Fig. 1-17. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 3 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	34
Fig. 1-18. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 4 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	35
Fig. 1-19. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 4 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	35

Fig. 1-20. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 5 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	36
Fig. 1-21. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 5 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	36
Fig. 1-22. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 6 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	37
Fig. 1-23. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 6 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	37
Fig. 1-24. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 7 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	38
Fig. 1-25. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 7 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	38
Fig. 1-26. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PMF 8 in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	39
Fig. 1-27. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PMF 8 in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	39
Fig. 1-28. Chemical structures of eight PMFs isolated from PRF (n-hexane fraction) .....	40
Fig. 1-29. Cytotoxicity of PRF on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	44
Fig. 1-30. Cytotoxicity of PMF 1 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	45
Fig. 1-31. Cytotoxicity of PMF 2 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	45
Fig. 1-32. Cytotoxicity of PMF 3 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	46
Fig. 1-33. Cytotoxicity of PMF 4 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	46
Fig. 1-34. Cytotoxicity of PMF 5 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	47
Fig. 1-35. Cytotoxicity of PMF 6 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	47
Fig. 1-36. Cytotoxicity of PMF 7 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	48
Fig. 1-37. Cytotoxicity of PMF 8 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	48
Fig. 1-38. Effect of PRF on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	49
Fig. 1-39. Effect of PMF 1 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	49
Fig. 1-40. Effect of PMF 2 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	50
Fig. 1-41. Effect of PMF 3 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	50
Fig. 1-42. Effect of PMF 4 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	51

Fig. 1-43. Effect of PMF 5 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	51
Fig. 1-44. Effect of PMF 6 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	52
Fig. 1-45. Effect of PMF 7 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	52
Fig. 1-46. Effect of PMF 8 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	53
Fig. 2-1. Photograph of <i>S. queipaertensis</i> Nakai .....	63
Fig. 2-2. Schematic diagram for fractionation of <i>S. queipaertensis</i> .....	65
Fig. 2-3. Schematic diagram for isolation of CHCl <sub>3</sub> fraction .....	66
Fig. 2-4. Schematic diagram for isolation of EtOAc fraction .....	66
Fig. 2-5. Syringe column system for the preparation of n-BuOH fraction ..	68
Fig. 2-6. 2D-contour plot of CHCl <sub>3</sub> fraction obtained by PDA detector system .....	72
Fig. 2-7. HPLC chromatogram of CHCl <sub>3</sub> fraction (at 280 nm detection wavelength) .....	72
Fig. 2-8. 2D-contour plot of EtOAc fraction obtained by PDA detector system .....	73
Fig. 2-9. HPLC chromatogram of EtOAc fraction (at 280 nm detection wavelength) .....	73
Fig. 2-10. 2D-contour plot of n-BuOH fraction obtained by PDA detector system .....	74
Fig. 2-11. HPLC chromatogram of n-BuOH fraction (at 280 nm detection wavelength) .....	74
Fig. 2-12. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-001 in DMSO-d <sub>6</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	80
Fig. 2-13. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-001 in DMSO-d <sub>6</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	80
Fig. 2-14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-002 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	81

Fig. 2-15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-002 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	81
Fig. 2-16. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-003 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	82
Fig. 2-17. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-003 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	82
Fig. 2-18. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-004 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	83
Fig. 2-19. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-004 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	83
Fig. 2-20. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-005 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	84
Fig. 2-21. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-005 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	84
Fig. 2-22. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-006 1 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	85
Fig. 2-23. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-006 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	85
Fig. 2-24. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-007 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	86
Fig. 2-25. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-007 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	86
Fig. 2-26. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-008 in DMSO-d <sub>6</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	87
Fig. 2-27. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-008 in DMSO-d <sub>6</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	87
Fig. 2-28. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-009 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	88
Fig. 2-29. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-009 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	88
Fig. 2-30. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-010 in DMSO-d <sub>6</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	89
Fig. 2-31. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-010 in DMSO-d <sub>6</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	89
Fig. 2-32. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-011 in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	90
Fig. 2-33. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-011 in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	90
Fig. 2-34. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of SS-012 in DMSO-d <sub>6</sub> (400 MHz for <sup>1</sup> H) .....	91
Fig. 2-35. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of SS-012 in DMSO-d <sub>6</sub> (100 MHz for <sup>13</sup> C) .....	91
Fig. 2-36. Chemical structure of phytochemicals isolated from <i>S. queipaertensis</i> .....	93
Fig. 2-37. Free radical scavenging activity of compounds isolated from <i>S. queipaertensis</i> in DPPH assay experiment .....	95
Fig. 2-38. Effect of SS-001 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	96
Fig. 2-39. Effect of SS-002 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	96

Fig. 2-40. Effect of SS-003 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	97
Fig. 2-41. Effect of SS-004 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	97
Fig. 2-42. Effect of SS-005 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	98
Fig. 2-43. Effect of SS-006 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	98
Fig. 2-44. Effect of SS-007 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	99
Fig. 2-45. Effect of SS-008 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	99
Fig. 2-46. Effect of SS-009 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	100
Fig. 2-47. Effect of SS-010 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	100
Fig. 2-48. Effect of SS-011 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	101
Fig. 2-49. Effect of SS-012 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	101
Fig. 3-1. Photograph of <i>Petalonia binghamiae</i> .....	106
Fig. 3-2. 2D-contour plot of MeOH extracts obtained by PDA detector system .....	112
Fig. 3-3. HPLC chromatogram of MeOH extracts (at 280 nm detection wavelength) .....	112
Fig. 3-4. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PB-001 in CD <sub>3</sub> OD (500 MHz for <sup>1</sup> H) .....	113
Fig. 3-5. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PB-001 in CD <sub>3</sub> OD (125 MHz for <sup>13</sup> C) .....	113
Fig. 3-6. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of PB-002 in CD <sub>3</sub> OD (500 MHz for <sup>1</sup> H) .....	114
Fig. 3-7. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of PB-002 in CD <sub>3</sub> OD (125 MHz for <sup>13</sup> C) .....	114

Fig. 3-8. Chemical structure of carotenoids isolated from *P. binghamiae* ..... 115

Fig. 3-9. Effect of PB-001 on the NO production in LPS-stimulated RAW  
264.7 cells ..... 117

Fig. 3-10. Effect of PB-002 on the NO production in LPS-stimulated RAW  
264.7 cells ..... 117



## ABSTRACT

This study was carried out to investigate biological activities of phytochemicals isolated from major plant resources distributed in Jeju Island as *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka (Jinkyul), *Sasa queipaertensis* Nakai (Jeju joritdae), and *Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova (Miyeokse).

The peel of *Citrus sunki* is a rich source of polymethoxyflavones (PMFs). In this study, a PMF-rich fraction (PRF) was obtained from the peel of *C. sunki* by hot-water extraction and subsequent fractionation with *n*-hexane. Six PMFs and two demethylated PMFs were isolated by Semi-prep LC, and their chemical structures were identified by <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The phytochemicals and PRF in *C. sunki* inhibited NO(Nitric oxide) production in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells(Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line). 5,7,4'-trimethoxyflavone, sinensetin, nobiletin, tangeretin, and PRF inhibited more strongly than other PMFs. We did the toxicity test in RAW 264.7 cells, using MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) release to compare the potential cytotoxicity of eight PMFs and PRF. As the results, the tangeretin and PRF were showed very low cytotoxicity in RAW 264.7 cells at 50 μM concentration. Also, We studied anti-oxidant effect by DPPH radical scavenging activity. DPPH radical scavenging activity was not observed in PRF and PMFs for the study of anti-oxidant effect.

*Sasa queipaertensis* NaKai is a native plant, which is distributed widely throughout Halla mountain of Jeju island. Its dried leaves are being used as a tea for the treatment of diabetes in Asia countries including Korea. We isolated phytochemicals using 80% EtOH from *S. queipaertensis*, and seven compounds were isolated for the first time. We also investigated 12 of



isolated compounds for DPPH radical scavenging activity. As the results, 3-*O-p*-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-*O-b*-glucopyranosyl propanol and tricin 7-*O-b-D*-glucopyranoside were showed more active than other compounds. And 2,3-dihydroxypropyl 9Z, 12Z-octadecadienoate showed a strong inhibition on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells, but not showed any effect on the MTT assay.

An edible brown alga, *Petalonia binghamiae* called 'miyeokse' is a traditional food in Korea, which is widely distributed in the Pacific, along the coasts of Korea, Japan, China and West of the USA. Its crude EtOH extract was eluted on reverse phase chromatography, and two compounds (fucoxanthin, fucoxanthin isomer) were isolated by Semi-prep LC. The anti-oxidants activity of those compounds were not observed on DPPH radical assay. The fucoxanthin isomer showed higher anti-inflammatory activity than fucoxanthin, and both compounds did not show any effect on the MTT assay.

In summary, several phytochemicals in *C. sunki*, *S. quepaertensis* and *P. binghamiae* showed biological activities such as inhibition of NO production and DPPH radical scavenging activities, suggesting that these might provide the leads for anti-inflammatory or anti-oxidative drugs.

Key word : *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka, *Sasa quepaertensis* Nakai, *Petalonia binghamiae*, RAW 264.7 cell, DPPH radical scavenging activity, anti-oxidant, anti-inflammatory.

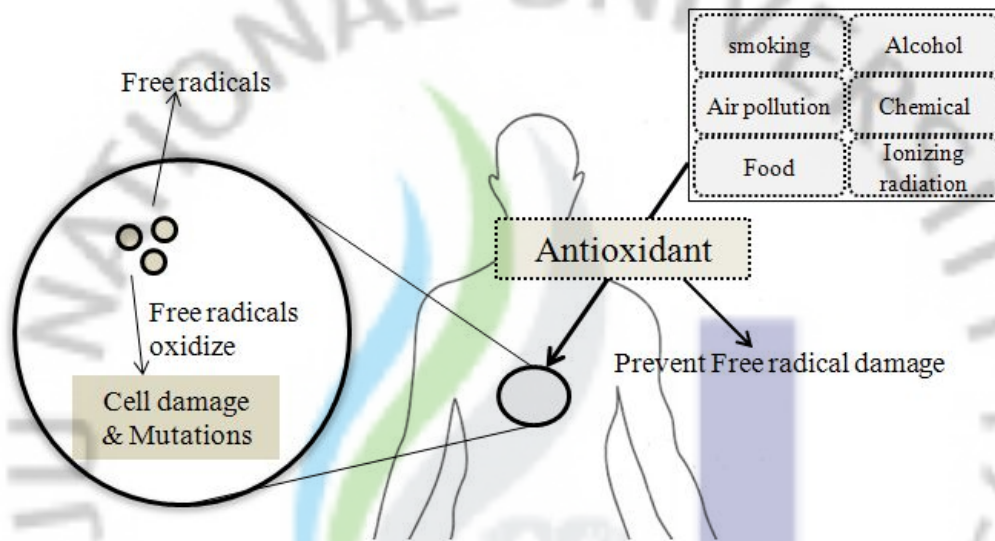
## I. 서 론

바이오산업은 21세기 이후 기술적, 산업적 파급효과를 가장 크게 나타낼 것으로 주목받고 있는 고부가가치 산업으로서, 경제적 기여도가 가장 클 것으로 예견되는 차세대 성장·동력산업의 하나로 주목받고 있다(김동명, 2006; 최윤희, 2007; Kwon et al., 2004). 이러한 바이오산업의 성장과 함께 최근 생활수준의 향상과 의학기술의 발달로 인하여 인간의 평균수명이 지속적으로 증가하고 있다. 생명연장과 더불어 현대사회는 고령화에 따른 노화와 신종플루와 같은 각종 질병들이 생겨나면서, 개인의 건강과 삶의 질 향상에 대한 관심이 고조되고 있는 상황이다(김창진, 1996). 이에 인간이 섭취하고 있는 식품이나 자연계에 존재하고 있는 식물체로부터 생리활성 기능을 나타내는 물질을 찾아내어 각종 질병의 치료제로 사용하기 위해 새로운 의약품의 소재개발을 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다(장현주, 2007; da Rocha et al., 2001; Kwok, et al., 2001; Rice-Evans, et al., 1996; Sies, 1997).

제주도는 동아시아 대륙 연변부에 위치하고 있으며 신생대 제 4기 화산활동으로 형성된 화산섬으로, 북상하는 쿠루시오 해류의 직접적인 영향을 받는 지역이다. 또한 한라산을 중심으로 사면이 바다로 둘러싸여 있어, 한반도와는 구별되는 독특한 환경적 특성을 보여주고 있다(문병찬과 정철환, 2005). 이러한 독특한 특색을 갖는 제주도는 유네스코지정 '생물권보존지역'으로 세계적으로 가치 있는 생물자원의 보고로 알려져 있으며, 식물자원 2,100여종(약용식물 338종), 해양자원 2,000여종, 동물·곤충 3,700여종 등 약 7,800여종 이상의 생물종다양성이 분포하고 있다(부성민, 1988; 제주하이테크산업진흥원, 2003). 또한 제주도는 천연에서 서식하는 생물종 외에도 다양한 감귤들이 자생 또는 재배되고 있다. 그 중 제주 재래감귤은 12종으로, 일부만이 소규모로 제주에서 재배되고 있다(강신해 등 2005; 김세재 2007).

이러한 천연자원들로부터 추출 분리한 많은 성분들은 실제 생활에 유용하게 응용되고 있으며, 이러한 노력은 인류의 생명연장, 질병 치료에도 크게 기여하고

있다(Dvorak, 2006; Marcucci, 2001; Schapoval, 1998). 특히 천연물로부터 분리된 생리활성 물질은 인공 합성품에 비해 부작용이 적고, 인체 내에서 안전성이 높다는 장점을 가지고 있다(박재한, 1991). 이처럼 천연자원에 대한 효능과 안전성으로 인해 동양권에서는 오랜 기간에 걸쳐 질병의 예방 및 치료에 천연물을 이용해 왔고 최근에는 과학적 접근을 통한 천연물 의약품 개발 연구가 활발하게 이루어지고 있다.



**Fig. 1. The relationship between the free radicals and antioxidant in the human body.**

모든 생물체는 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 유해산소로 불리는 활성산소(superoxide radicals, hydroperoxy radicals, organic peroxide radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals)들의 상해에 대한 근본적인 자기 방어 시스템을 갖추고 있다(Cross, 1987). 하지만 이러한 조직 방어 시스템에서 해리 되지 못한 활성산소로 인하여 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형 상태가 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 유발하게 된다(Alamdari et al., 2008). 이러한 산화적

스트레스로 작용하는 활성산소는 우리가 호흡하는 산소(O<sub>2</sub>)가 유해산소로 바뀌면서 생성된다. 인간을 비롯한 모든 생명체들은 생존과 활동에 필요한 에너지를 공급받기 위해 필연적으로 음식으로부터 탄수화물과 지방의 대사에 의존하게 된다. 이러한 열량소들이 에너지를 생산하기 위해서는 산소의 공급이 필수적이며, 이때 공급된 산소는 세포내 미토콘드리아의 대사과정에 이용되고, 그 중 약 2% 정도가 우리 몸에 해가 되는 불안정한 산소화합물인 유해산소 또는 활성산소라고 부르는 자유 유리기(free radical)로 변하게 된다(Defeng and Cederbaum, 2003). 이러한 자유 유리기의 대부분은 큰 반응성을 갖고 있는 불안정한 분자나 화합물로 존재하며, 대기오염, 담배, UV, 화학성분, 전리방사선 등에 의해 생성된다(Bohm et al., 2001; Defeng and Cederbaum, 2003; Yao et al., 2008). 이러한 자유 유리기는 인체의 다양한 조직에 산화적 손상을 입히며, 더 나아가 암, 고혈압, 심장병, 동맥경화와 같은 만성질환을 일으키는 요인으로 작용한다(Al-Dabbas et al., 2007; Letelier et al., 2008). 따라서 항산화제나 항산화 효소(glutathione, vitamin A, vitamin C, vitamin E, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase)를 사용하여 활성산소의 생성을 억제하는 방법으로 잔존하는 활성산소를 제거하기 위한 연구들이 수행되어 왔다(Fig. 1; Ripple et al., 1997).

대표적인 항산화제 중 가장 많이 이용되는 화합물은 BHA(butylated hydroxy anisol)와 BHT(butylated hydroxy toluene) 등과 같은 합성화합물이다(Branen, 1975). 일반적으로 페놀계 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA와 BHT는 그 효과와 경제성 그리고 안정성 때문에 많이 사용되어 왔지만, 최근 합성 식품첨가물의 일반적인 기피 현상뿐만 아니라 과량 섭취 시 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성 작용을 일으키는 것으로 알려지면서, 이들이 갖는 여러 가지 기능을 대체할 수 있는 천연 물질의 개발이 더욱 필요시 되고 있다(Choe and Yang, 1982). 이러한 이유로 보다 안전한 천연물로부터 폴리페놀 화합물과 같은 유효한 활성을 나타내는 항산화제를 찾기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다(Katiyar et al., 2008; Lee et al., 2007; Rice-Evans et al., 1995). 항산화제를 개발하기 위해 천연물로부터 자유 유리기 소거능을 탐색하기 위한 화학적 분석법은 ABTS (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power) ORAC (oxygen radical

absorption capacity) 분석법 등이 사용되고 있는데(Thaipong et al., 2006), 이러한 탐색법 중 대표적으로 자유 유리기에 대한 소거능을 관찰하는 방법이 DPPH 라디칼 분석 방법이다(Schlesier, et al., 2002). DPPH 라디칼 분석법은 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 된다(Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006). 즉, DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있는데 Fig. 2에서와 같이 515 ~ 517 nm에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 라디칼을 소실하게 되면 측정 과정에서 흡수가 없어지게 된다. 이를 대조구의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타내어 시료의 환원력 크기, 라디칼 제거활성, 항산화 활성으로 표시하게 된다(Bortolomeazzi et al., 2010, Chandrasekar et al., 2006; Endo et al., 2006).

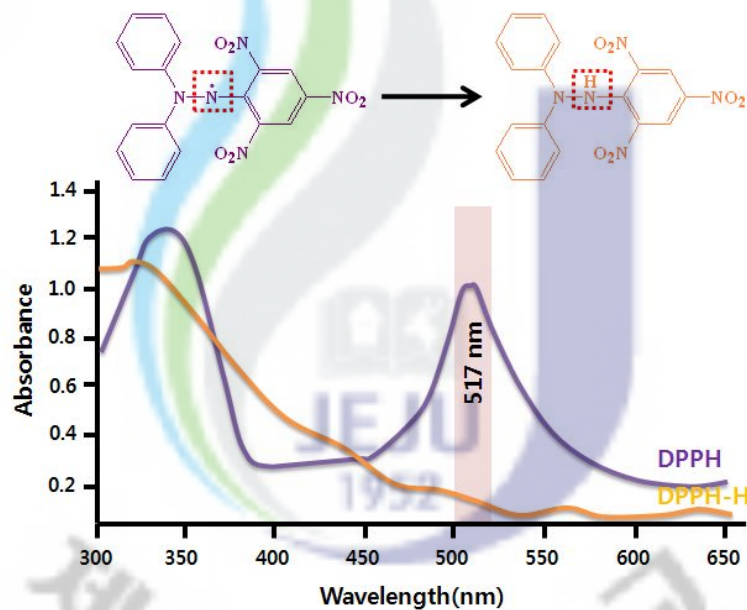


Fig. 2. Absorbance change at 517 nm caused by the reaction of anti-oxidants with the free radical of DPPH

일반적으로 염증반응(inflammation reaction)은 외부의 자극(세균, 바이러스 등)에 대해 우리 몸에서 반응하는 방어반응 중 하나로, 외부 자극이 발생하면 면역세포의 방어반응이 활성화되고 활성화된 면역세포에서 염증 반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응이 유발된다(Abul and Abbas, 2006).

대식세포(macrophage)는 동물체 내 모든 조직에 분포하며 인체 내 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로서, 외부로부터 침입하는 이물질이나 세균, 바이러스, 노화세포 등을 포식하고 소화하는 식균작용을 하는 고전적인 기능과 다양한 염증매개물질들을 분비하여 면역조절을 통해 생체 내 방어기능과 항상성 유지 기능을 조절하는 등, 초기 염증반응에서 핵심적인 역할을 한다(Bosca et al., 2005; Nathan, 1992). 내독소로 알려진 LPS (lipopolysacchride)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7 세포와 같은 대식세포 또는 단핵백혈구(monocyte)에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF-a), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1b (IL-1b)와 같은 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 증가시키는 자극물질로, LPS를 처리하여 세포를 자극시키면 세포는 이에 대한 방어반응으로서 NO (Nitric oxide)를 생성시킨다(전용필 등, 2009; Axtelle and Pribble, 2001). NO는 nitric oxide synthase (NOS)라는 NO 생성 효소에 의해 생성되는데 NOS는 L-arginine의 guanidine group과 반응하여 L-hydroxyarginine으로 전환시키고 이를 최종 산물인 NO와 L-citrulline으로 생성하도록 한다(Furchgott and Zawadzki, 1980; Kim et al., 1999). NOS는 세 가지 형태가 존재하는 것으로 알려져 있다. 그 중 inducible NOS (iNOS)는 염증 반응에서 각종 cytokine과 bacteria 산물인 LPS와 endotoxin 등에 의해 전사단계에서 발현이 증가된다(Nathan, 1992). LPS는 대식세포에서 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 등과 같은 전사인자를 포함하는 toll-like receptor(TLR)-4에 의한 신호 경로를 활성화 시켜 iNOS와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시키고 이들은 각각 NO와 prostaglandin E2 (PGE 2)를 생성시킨다(Fig. 3; Kim et al., 2010). 이때 생성되는 NO는  $O^2$ 와 반응하여 세포에 가장 toxic한 ONNO(peroxynitrite)를 생성시켜 target 세포에 대한 독성을 상승시키고, 세포의 사멸을 유도하거나 염증반응을 유발시킨다(김나리, 2007).

이러한 체내 염증반응의 과정에서 발생하는 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다(Choi et al., 2007; Ryu et al, 2003). 그 중 소량의 NO 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시

키는 역할을 한다. 그러나 염증 반응과 같은 iNOS에 의한 NO의 과잉 생성은 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 다양한 질병을 야기한다(Stuehr et al., 1991; Yang et al., 2008). 과도한 면역반응이 야기되면 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 되는데, 조직변질, 순환장애, 조직 증식의 유발 등 과도한 염증 반응은 암, 당뇨, 크론병, 류마티스성 관절염, 동맥경화, 당뇨, 알츠하이머와 같은 질환의 원인으로 작용하거나, 수반되어 일어난다고 알려져 있다(신혜선, 2010; Tracey, 2002).

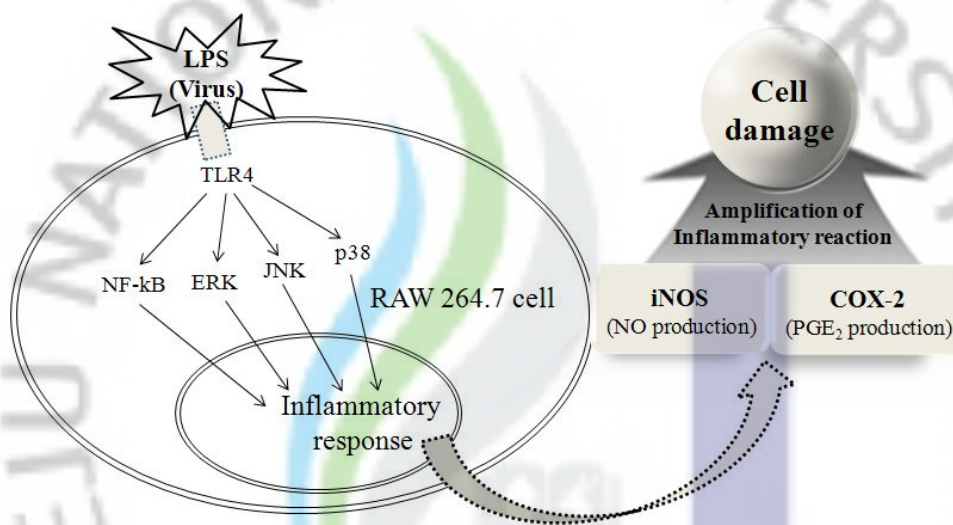


Fig. 3. NO production and inflammation reaction in RAW 264.7 cells.

최근 과도한 자유 유리기와 NO의 생성으로부터 야기되는 다양한 질병에 대한 예방과 치료를 위해 천연자원에서 이들 활성을 억제시키는 유효성분을 탐색하기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다. 본 연구는 제주도에서 자생하는 진굴(산굴), 제주조릿대, 미역쇠에 존재하는 항산화 및 항염 활성 유효성분을 탐색·분리하고, 이들의 화학구조를 밝히기 위한 목적으로 수행되었다. 그리고 이러한 연구를 통하여 제주도 자생식물을 원료로 천연물 식의약품 소재를 개발하기 위한 기반을 마련하고자 하였다.

## II. 결과 및 고찰

### Part II-1. 진굴 분리 PMFs 조성물(PRF)과 PMFs의 생리활성

#### 1. 이론적 고찰

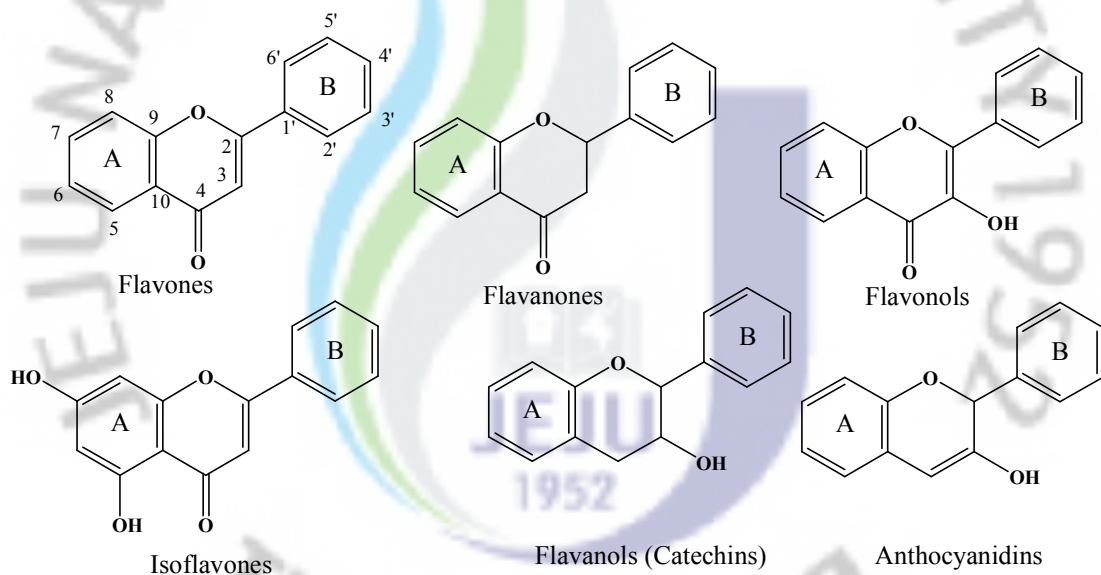
감귤류는 운향과(Rutaceae)의 감귤아과(Aurantioideae)에 속하는 식물로서 Tanaka (田中)는 감귤아과를 8속 (tribe)으로 나누고 35속에 포함시켰다. 감귤족 (tribe Aurantioideae)은 4아족과 6속으로 분류되고 있으며 실제로 재배되는 것은 감귤속(Citrus), 금각속(Fortunella), 탕자속(Poncirus)의 3속이다. 이들 3속의 원생 분포는 인도에서 중국 중남부에 걸쳐 아시아 대륙 동남부와 이들 주위에 있는 여러 섬으로 추정하고 있다.

통계청에 따르면 국내에서 생산되는 과일 중에서 가장 많은 수확량을 나타내는 감귤은 2001년을 기준으로 하여 감귤 생산면적이 지속적으로 감소하고 있는 추세에 있다. 이에 반해 감귤 생산량은 2003년 58.4 만톤과 2007년 77.8 만톤의 생산량을 제외하고는 2001년부터 매년 약 63만톤 수준의 생산량을 유지하고 있다(통계청, 2010). 감귤류의 과피에는 페놀산, 플라보노이드와 같은 페놀화합물이 매우 풍부하여 천연 항산화제와 같은 자원화 개발이 필요한 상황이지만(Yusof et al., 1990), 감귤의 과육을 제외하고는 대부분 부산물로 처리되고 있다(Kroyer, 1986; Pratt and Hudson, 1990).

플라보노이드란 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래되었고 과일껍질, 채소의 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗, 꽃 등 식물에 광범위하게 존재하는 천연 화합물의 일종이다. 이러한 플라보노이드는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>와 같이 15개의 탄소를 기본 골격으로 하는 diphenylpropane인 폴리페놀 화합물로서 두 개의 페닐 그룹에 이중 결합의 유무와 결합위치, 히드록시기(-OH) 및 메톡시기(-OCH<sub>3</sub>)의 결합 등에 의해



flavones, flavanones, flavonols, isoflavones, anthocyanidins, flavanols(or catechins)의 6개 구조로 분류된다(Fig. 1-1). 현재까지 식물에서 4,000 여종의 플라보노이드가 보고되었다(Kuhnau 1976; Tripoli et al., 2007). 플라보노이드는 항암 활성, 항알레르기 활성, 항염 활성, 지질과산화 저해작용, 항혈소판 작용, 항허혈 작용 등과 같은 다양한 생리활성들을 가지고 있으며(Brown, 1980; Choi et al, 2007; Deschner et al., 1991; Elangovan et al, 1994; Rump et al, 1995; Terao et al., 1994; Tzeng et al., 1991), lipoxygenase, cyclooxygenase, monooxygenase, xanthin oxidase, mitochondrial succinoxidase, NADH-oxidase, phospholipase A2, protein kinases와 같은 활성산소나 라디칼을 유발하는 효소들에 대한 억제 활성도 보고되고 있다(Cao et al 1997).



**Fig. 1-1. Chemical structures of typical plant flavonoids.**

감귤류는 다른 식물들에 비해 많은 플라보노이드를 함유하는 식물로 과피와 씨 부위에 다량의 플라보노이드를 함유하고 있다(Bocco et al., 1998; Mandalari et al., 2006). 보편적으로 감귤에 존재하는 플라보노이드를 'citrus flavonoid' (Fig. 1-2)라 부르며, 현재 60 여종이 플라보노이드가 보고되고 있다(Kuhnau 1976;

Nogata et al., 2006; Tripoli et al., 2007), 이 중 PMFs는 감귤류에만 존재한다(Zhou et al., 2007). PMFs는 항알레르기, 항염, 항산화, 항증식, 항바이러스, 암예방 활성을 지니며, 포유류의 고중성지방혈증을 개선하고, 항당뇨 효능을 갖는 다고 알려져 있다(Kobayashi and Tanabe 2006; Wu, Y.Q., 2006; Anagnostopoulou et al., 2005; kawaii et al, 1999; Yanez et al., 2004; Jayaprakasa et al., 2000; Li et al., 2006).

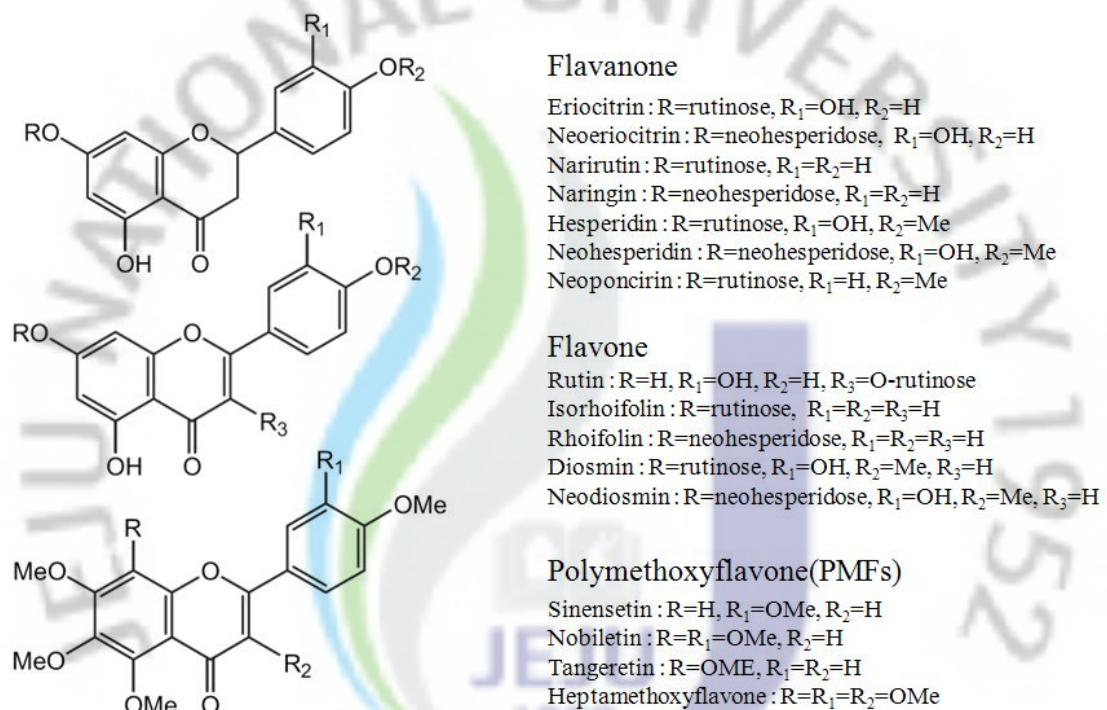


Fig. 1-2. Chemical structures of Citrus flavonoids (Nogata et al., 2006).

PMFs 중에서 감귤과피에 가장 많은 양으로 존재하는 것은 nobiletin (5,6,7,8,3',4'- hexamethoxyflavone)과 tangeretin (5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone)이다(Nagato et al., 2006; Raman, et al., 2005). Nobiletin은 인간의 섬유아세포 (synovial fibroblasts)와 마우스의 대식세포(macrophages)에서 항염 활성을 가진 다고 보고되었고(Lin et al., 2003), hamster의 피지생성과 피지세포(sebocyte)의

증식을 억제시키고 피지분비를 증대시키며(Sato et al., 2007), 콜라겐을 형성하는 섬유아세포로부터 생성된 육종세포인 human fibrosarcoma HT-1080 세포에서 항종양 전이를 나타내는 MEK 억제 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Miyata et al., 2008). 또한 nobiletin을 투여한 마우스의 소변으로부터 얻어진 nobiletin의 대사산물인 3'4'-didemethylnobiletin은 항염과 항암 효과가 투여된 nobiletin보다 증대된다는 연구결과도 보고되었다(Lai, et al., 2008). Tangeretin은 인간 폐암(lung carcinoma)세포에서 p38 MAPK, JNK, AKT 활성의 억제를 통해 cyclooxygenase(COX)-2가 유발된 IL-1 $\beta$ (염증 반응을 매개하는 cytokine)를 억제한다(Chen et al., 2007). 또한 인간 대장선암(colorectal carcinoma) 세포에서 사이클린 의존성 키나제(cyclin-dependent kinases, Cdk) 억제제인 p21과 p27을 활성화시킬 뿐만 아니라 Cdk 2와 Cdk 4의 활성 억제를 통해 G<sub>1</sub> 1기의 cell-cycle을 억제하며(Pan et al., 2002), 백혈병(leukaemic HL-60) 세포의 성장을 저해하는 작용을 한다고 보고되고 있다(Hirano et al., 1995). Nobiletin과 tangeretin 외에도 감귤류에는 다양한 PMFs가 존재한다고 알려져 있다. 그 중 sinensetin은 antioxidative 효과와 인간의 적혈구 응집과 혈구침전의 비율을 감소시키며(Akowuah et al., 2004; Amazad hossanin et al., 2009; El-Shafae, 2002), 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone은 human leukemia 세포에서 ROS (reactive oxygen species) 생성, growth arrest, DNA 손상으로 유도된 Gene 153(Growth Arrest and DNA Damage induced-153, GADD153)의 발현과 caspase 활성을 통해 apoptosis를 유도한다고 보고되었다(Pan et al., 2007).

최근 들어 다양한 PMFs의 기능적 가치가 재조명되면서 PMFs를 분리방법에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다. Li 등에 따르면, 초임계 유체 크로마토그래피로부터 nobiletin을 효과적으로 분리하는 방법과(Li et al, 2007), 순상과 역상 실리카겔 크로마토그래피 방법을 사용하지 않고, 키랄(chiral) 컬럼과 정제 순환 방식으로부터 'g' 단위의 nobiletin을 얻는 방법을 제시하였다(Li et al, 2006). 또한 HL-60 세포의 억제제인 PMFs와 hydroxylated PMFs를 감귤과피로부터 분리하고, 분리된 PMFs로부터 또다른 PMFs를 합성하여 그들의 항암효과에 대한 효능을 보고하였다(Li et al., 2007). 그리고 비수용성 조건에서 PMFs의 흡착력을 이용하여 nobiletin과 tangeretin을 분리하는 방법도 보고되었다(Raman, et al.,

2005). 그러나 PMFs 화합물의 분리·정제 기술에 대한 연구들은 많지만, PMFs를 다량 함유하는 조성물의 제조 방법에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 특정 화합물과 그 화합물만을 정제하는 기술은 다양한 분리 단계와 고도의 정제기술이 필요하기 때문에 대부분 PMFs를 다량 함유하는 조성물은 PMFs를 다량 함유하는 감귤과피로부터 추출하거나 특정회사의 원료에서 공급받고 있다(Abe et al., 2007; Fan et al., 2007; Li et al., 2007; Wang et al., 2008).

따라서 본 연구에서는 PMFs를 다량 함유하는 제주 재래귤인 진귤과피로부터 유용한 생리활성을 갖는 PMFs를 다량 함유한 조성물(PRF)을 분리하였다. 또한 PRF에 함유된 8개의 PMFs를 크로마토그래피법을 이용하여 분리·동정하였고, PRF와 개별 PMF의 항산화, 항염 활성을 비교함으로써 이들의 기능성 소재로서 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료 및 사용기기

#### 1) 재료

본 실험에 사용된 진귤 혹은 산귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka)은 제주에서 자생하는 재래감귤로 제주특별자치도 서귀포시 농가에서 2007년 1월 ~ 2월에 걸쳐 채집하였다(Fig. 1-3). 채집된 진귤은 흐르는 물에 수세한 뒤 과피와 과육을 분리시키고, 분리된 과피를 동결건조기로 건조시켜 시료로 사용하였다.



Fig. 1-3. Photograph of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka.

#### 2) 시약

진귤과피에 함유되어 있는 플라보노이드의 함량을 확인하기 위한 표준물질로 rutin, naringin, hesperidin, quercetin, naringenin, hesperetin는 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)사의 표준시약을, sinensetin, nobiletin, tangeretin은 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)사의 표준시약을 사용하였다.

또한 시료의 전처리 및 이동상의 제조를 위한 용매는 Fisher Scientific Korea(Seoul, Korea)사의 HPLC 등급 용매를 사용하였다.

### 3) HPLC system

진굴로부터 PMFs의 정성, 정량, 분취를 위해 HPLC system (Waters사, 2695 Alliance system, USA)을 사용하였다. HPLC는 펌프, 컬럼 오븐, 자동시료주입기, PDA 검출기(Waters 사, Waters 2998 photodiode array detector, USA)로 구성되어 있으며, 시료 루프의 용량은 100  $\mu$ L이다.

### 4) NMR Spectrometer

구조분석에 이용된 NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 분광기는 400 MHz FT-NMR (JEOL 사, JNM-LA, Japan)을 이용하였고, 측정 시 용매는 Merck사의  $\text{CDCl}_3$ 을 사용하였다.

## 2-2. 시료의 분리 및 분석

### 1) 시료의 추출 및 분획

건조된 500 g 산굴과피에 5.0 L 증류수를 가하고 100 $^{\circ}$ C로 가온하여 1시간 동안 추출하였다. 얻어진 열수추출액은 원심분리기(Hanil Science INdustrial., Supra 25K, 한국)를 이용하여 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 여과지로 여과하였다. 여액은 상온에서 방치한 후 5개로 나누었고, 그 중 4개의 추출액은 각각 n-hexane, chloroform( $\text{CHCl}_3$ ), ethyl acetate(EtOAc), n-butanol (BuOH)로 3회에 걸쳐 용매분획하였다. 각 용매분획층은 회전농축기(Buchi R-200, Switzerland)를 사용하여 40 $^{\circ}$ C에서 감압농축하였다.

## 2) 표준용액의 조제

플라보노이드 정량 분석을 위한 표준용액은 rutin, naringin, hesperidin, quercetin, naringenin, hesperetin을 각각 100 mg, nobiletin, tangeretin 각각 10 mg, sinensetin 5 mg을 10 mL DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해한 후 5분 동안 초음파 용해시키고 100 mL로 정용하였다. 그리고 표준물질의 농도는 rutin을 기준으로 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50, 1.0 mg/mL가 되도록 조제하여 이를 표준용액으로 사용하였다.

## 3) 플라보노이드의 분석

각 분획물은 MeOH로 용해한 후 동량의 EtOAc를 첨가하여 5분 동안 초음파 용출시키고, 0.50  $\mu\text{m}$  테프론(PTFE, polytetrafluoroethylene) 주사기 필터 (Advantec Toyo Roshi Kaisha Ltd., DISMIC<sup>R</sup>-13<sub>jp</sub>, Japan)로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 플라보노이드는 HPLC (Waters사, 2695 Alliance system, USA), Sunfire<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 컬럼 (250  $\times$  4.6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ), 10  $\mu\text{L}$  주입부피, 컬럼 온도 40 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 함량을 분석하였다. 용리액은 각각 0.5% acetic acid/acetonitrile과 초순수를 사용하였고, 1.0 mL/min 유속으로 28 분 동안 플라보노이드를 탐색하였다(Table 1-1). 9개의 표준물질은 각 표준물질 표준검정곡선의 직선성, 피크의 머무름 시간, UV 스펙트럼의 일치여부들을 확인하여 시료를 분석하였다(Table 1-2).

**Table 1-1. Gradient elution condition for HPLC separation.**

Time (min)	Flow (mL/min)	MeCN (%)	Water (%)
0	1.0	20	80
8	1.0	40	60
15	1.0	40	60
18	1.0	60	40
24	1.0	60	40
27	1.0	90	10
30	1.0	90	10
31	1.0	20	80
37	1.0	20	80

**Table 1-2. Linear regression results of standard calibration curves using nine flavonoid standards.**

Standards	$r^a$	$A^b$	$B^c$
Rutin	0.999636	$9.94 \times 10^6$	$2.18 \times 10^4$
Naringin	0.999584	$3.18 \times 10^6$	$5.58 \times 10^3$
Hesperidin	0.999556	$3.24 \times 10^6$	$1.13 \times 10^3$
Quercetin	0.999605	$1.60 \times 10^7$	$9.81 \times 10^4$
Naringenin	0.999554	$8.89 \times 10^6$	$1.16 \times 10^4$
Hesperetin	0.999542	$8.16 \times 10^6$	$1.08 \times 10^4$
Sinensetin	0.999593	$4.47 \times 10^4$	$2.64 \times 10^3$
Nobiletin	0.999574	$3.64 \times 10^4$	$5.68 \times 10^3$
Tangeretin	0.999598	$4.46 \times 10^4$	$7.27 \times 10^3$

$r^a$ : correlation coefficient; Linear equation formula:  $y = Ax + B$ ;  $y$  = peak areas;  $A^b$ : slope;  $B^c$ : intercept;  $x$  = concentration (mg).



#### 4) PMFs의 분리

PMFs의 분리는 건조과피 시료 1.5 kg을 플라보노이드의 방법과 동일하게 n-hexane 분획물을 전처리하여 수행하였다. 분취용 prep-LC로는 Waters 2695 Alliance system을, 분취용 컬럼은 Symmetryprep™ C<sub>18</sub> 컬럼 (7.8 × 300 mm ID, 7 μm)을 사용하였고, 컬럼 온도는 40°C를 유지하였다. PMFs는 PDA 검출기를 이용하여 200 ~ 400 nm 범위의 UV 흡광도에서 검출하였고, 이동상은 MeOH과 초순수를 사용하여 기울기 용리법으로 분리하였다(Table 1-3). 유속은 1.8 mL/min을 유지하여 PMFs를 분획 수집기에 분취하였고, 머무름 시간이 동일한 분획물을 합하고 농축한 후 NMR 분광법으로 화합물의 구조를 분석하였다.

**Table 1-3 Gradient elution condition for prep-LC separation.**

Time (min)	Flow (mL/min)	MeOH (%)	Water (%)
0	1.8	20	80
36	1.8	90	10
38	1.8	90	10
40	1.8	20	80
47	1.8	20	80

#### 2-3. 생리활성 평가

##### 1) DPPH 자유 유리기 소거활성 측정

시료의 전자공여능 측정은 Blois 방법 (Blois, 1958)에 따라, DPPH(Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다. 먼저 메탄올에 희석시킨 PMFs를 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 μM 농도로 100 μL 씩 96 well plate에 분주하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하였다. 그리고 96 well plate를 차광상태에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값은 시료의 흡광도를 기준으로 표준화하였고, 대조군으로는 ascorbic acid와 BHA (Sigma, USA)를 사용하였으며,

소거능은 아래 식에 의해 산출된 값을 3회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성 (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

$A_{\text{control}}$  = 메탄올 첨가 반응액 흡광도

$A_{\text{sample}}$  = 시료 첨가 반응액 흡광도

## 2) 대식세포 배양

대식세포(마우스 RAW 264.7)는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였고, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin /streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 포함된 Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

## 3) MTT assay

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT 분석법으로 미토콘드리아의 환원력을 측정하였다(Ferrari et al., 1990). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에  $3 \times 10^4$  cells/well로 넣고 24시간 배양하였다. 그리고 여기에 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{M}$  농도의 시료를 넣고 한 시간, 다시 LPS (Sigma, USA)를 100 ng/mL이 되도록 첨가한 후 24시간 배양하였다. 이후 3-(4,5-dimethylthazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA)를 최종 0.4 mg/mL이 되도록 넣고 한 시간 배양 후 배지를 제거하였다. 200  $\mu\text{L}$ 의 DMSO(Amresco, USA)를 가하여 formazan 침전물을 용해시키고 microplate reader (Bio-tek, USA)로 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리한 군의 세포독성은 시료를 처리하지 않은 군과 흡광도를 비교하여 평가하였으며 세포독성은 다음의 식에 의해 산출하였다. 시료는 3-4회 반복 실험 후 산출된 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = 추출물 미처리군

$A_{\text{sample}}$  = 추출물 처리군

#### 4) LDH assay

세포 배양액을 이용하여 세포 손상을 측정하는 LDH 분석법으로 세포독성을 측정하였다(He et al., 2002). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well cell culture plate에  $3 \times 10^4$  cells/well로 넣고 24시간 배양한 후, 여기에 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{M}$  농도의 시료를 넣고 한 시간 배양하고 LPS를 100 ng/mL이 되도록 첨가한 후 22시간 배양하였다. 그리고 배양액 50  $\mu\text{L}$ 에 LDH 측정 혼합액(LDH Cytotoxicity Detection Kit; TaKaRa, Japan) 50  $\mu\text{L}$ 를 넣고 반응시켰고, HCl의 최종 농도가 0.2 N이 되도록 처리하여 반응을 정지시켰다. 이를 microplate reader로 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 세포에 Triton X-100 (Sigma, USA) 용액을 최종 1%가 되도록 처리한 세포 배양액을 사용하였으며 세포 상해 비율은 아래 식으로 산출하였다. 시료는 3회 반복 실험 후 산출한 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{lower control}}) / (A_{\text{upper control}} - A_{\text{lower control}})$$

$A_{\text{sample}}$  = 시료 처리군에서 방출된 LDH 활성

$A_{\text{lower control}}$  = 시료와 Triton-X100 용액 미처리시 방출된 LDH 활성

$A_{\text{upper control}}$  = Triton-X100 용액 첨가시 방출된 LDH 활성

#### 5) NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에서 생성된 NO의 양은 Griess법을 이용하여  $\text{NO}_2^-$  형태로 측정하였다. Griess 분석은 세포배양액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 이때 Griess 시약은 1% (W/v) sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine

dihydrochloride/2.5% (v/v) phosphoric acid 용액을 혼합하여 조제하였다. 그리고  $\text{NO}_2^-$  정량분석은 아질산나트륨 표준용액을 사용하여 표준검정곡선을 작성한 후 이를 이용하여 생성된 NO 값을 산출하였다.



### 3. 결 과

#### 3-1. PRF의 제조 및 함량분석

역상 컬럼(C<sub>18</sub>)을 이용하여 플라보노이드 표준물질의 분리도를 확인하였다. 그 HPLC 크로마토그램 결과를 보면 3가지 패턴으로 나뉘어 진다(Fig. 1-4): Group 1(배당체가 결합된 플라보노이드), Group 2(배당체가 결합되지 않은 플라보노이드), Group 3(폴리메톡시기가 결합된 플라보노이드). PMFs가 검출되는 Group 3의 경우 다른 두 개의 Group에 비하여 역상 컬럼에서 가장 긴 머무름 시간을 갖고 있는 것은 폴리메톡시가 결합된 플라보노이드가 다른 플라보노이드에 비해 가장 비극성인 성질을 갖고 있기 때문이다.

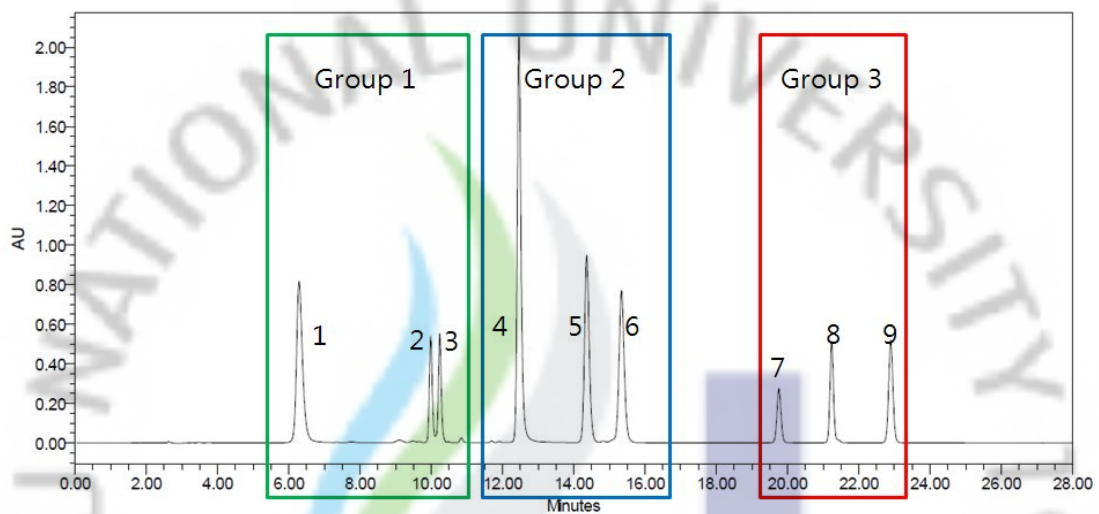
제주 채래굴인 산굴의 성숙과피를 원료로 PMFs를 다량 함유하는 조성물 (PMFs-rich fraction, PRF) 제조방법을 개발하기 위하여, 우선 진굴 과피를 뜨거운 물로 추출하여 열수 추출물에 PMFs의 함유 여부를 확인하였다. Fig. 1-5에서 보여주는 바와 같이 열수 추출물은 Group 3의 플라보노이드를 함유하고 있었다. 따라서 가장 비극성 성질을 갖는 PMFs를 추출하기 위해 비극성 용매인 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH을 사용하여 용매분획을 실시하였고, 각 분획물에 함유된 PMFs의 함량을 확인하였다(Fig. 1-6 ~ 1-9, Table 1-4).

각 분획물이 함유하고 있는 PMFs의 함량을 Table 1-4에 요약하였다. n-hexane 분획물은 sinensetin, nobiletin, tangeretin이 각각 3.4, 214.4, 540.4 mg/g으로 75.8%의 PMFs 함유량을 나타내었다. n-hexane 분획물은 다른 분획물에 비해 가장 높은 PMFs 조성비를 나타내기 때문에 “PRF (polymethoxyflavone-rich fraction, PRF)”라 명명하였다. CHCl<sub>3</sub> 분획물은 n-hexane보다 많은 sinensetin(35.5 mg/g)과 nobiletin(259.4 mg/g)을 함유하고 있지만, tangeretin은 284.6 mg/g으로 PRF보다 적게 분석되었다. EtOAc과 n-BuOH 분획물은 n-hexane과 CHCl<sub>3</sub> 분획물보다 nobiletin과 tangeretin의 함량은 적었지만, naringin과 hesperidin의 함량은 두 분획물보다 높게 나타났다. 열수 추출물의 플라보노이드 함량은 Group 1이 다른 Group에 비해 많은 양으로 존재하고 있었으

며, Group 3에서는 n-BuOH 분획물을 제외하고는 가장 낮은 함량을 보였다. 그리고 진굴 과피로부터 얻어진 분획물과 열수 추출물에서 Group 2의 플라보노이드는 검출되지 않았다.

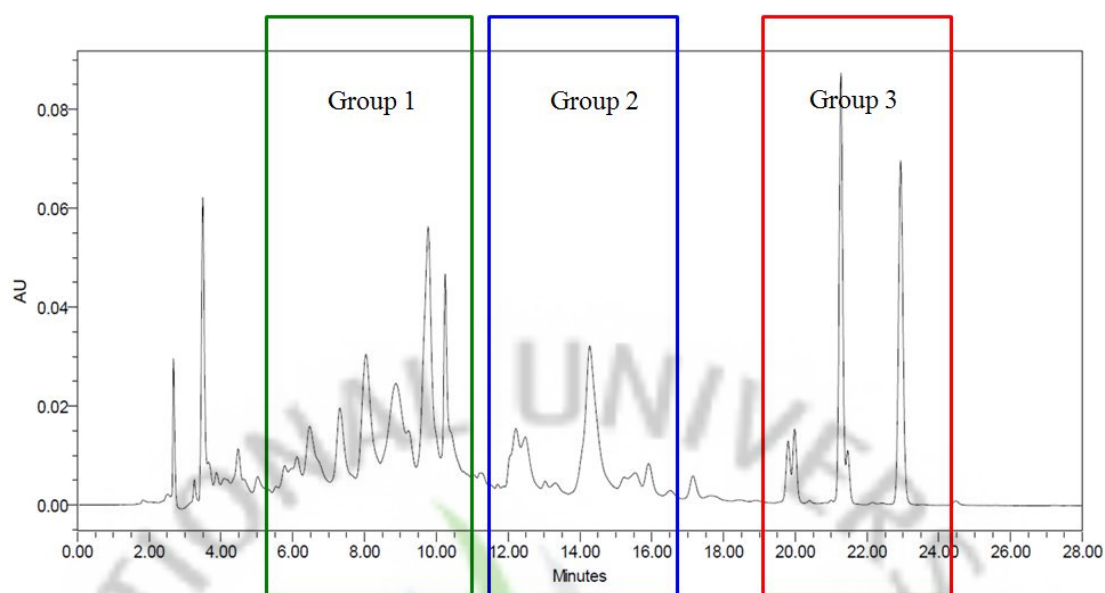
특히 n-hexane 분획물에는 sinesetin, nobiletin, tangeretin의 피크 외에 Group 1과 Group 2에 존재하는 플라보노이드의 피크는 나타나지 않았다. 그리고 PMFs 이라고 예상되는 Group 3 범위의 머무름 시간 부근에서 다소 작은 피크들이 검출되는 것으로 보아 n-hexane 분획물, 즉 PRF는 표준물질로 검출된 3개의 PMFs 외에도 더 많은 PMFs를 함유하는 것으로 예상되었다. 따라서 가장 높은 PMFs 조성비를 나타내는 n-hexane 분획물의 나머지 성분들을 Semi-prep LC를 사용하여 분리하였다.





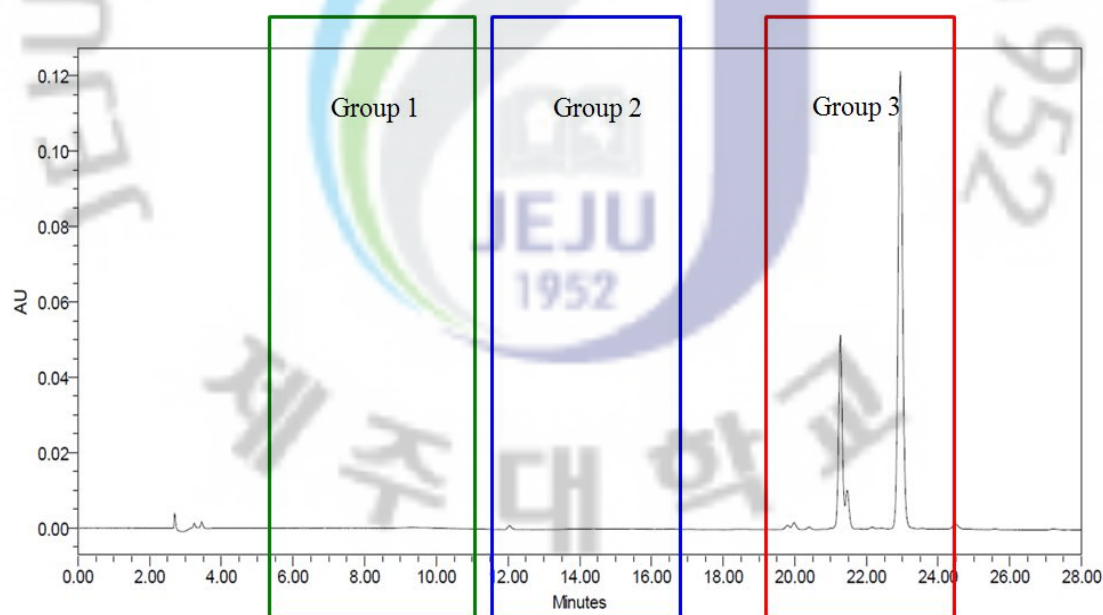
**Fig. 1-4. HPLC chromatogram of flavonoid standards.**

Chromatogram peaks were divided into three groups, based on the HPLC separation results: peak 1, rutin; peak 2, naringin; peak 3, hesperidin; peak 4, quercetin; peak 5, naringenin; peak 6, hesperetin; peak 7, sinensetin; peak 8, nobiletin; peak 9, tangeretin.; Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type; Group 3, PMFs type.



**Fig. 1-5 HPLC chromatogram of hot water extraction.**

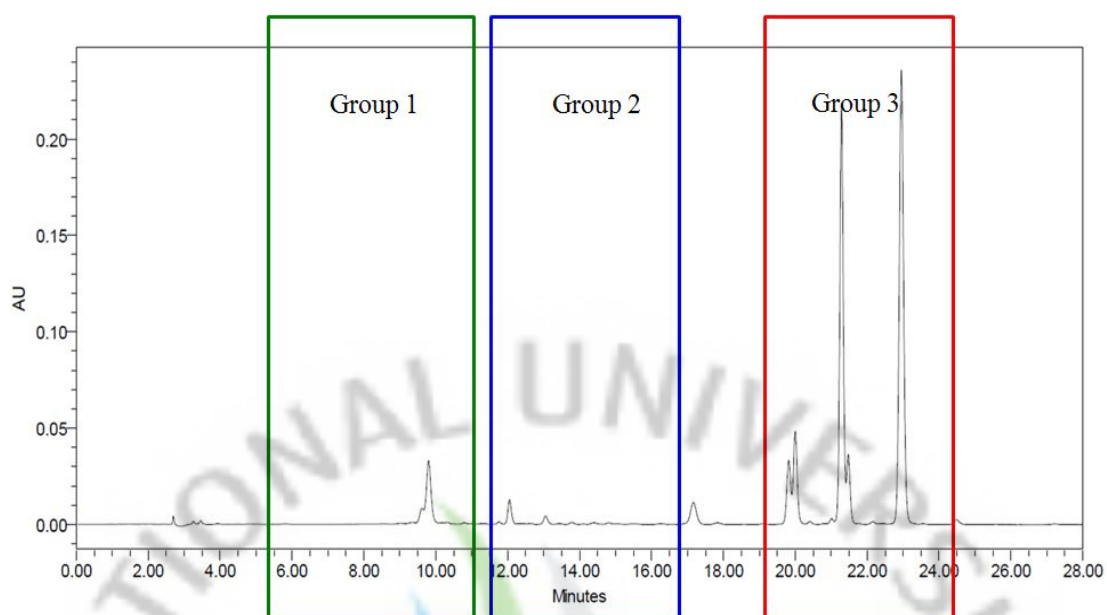
Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type;  
Group 3, PMFs type.



**Fig. 1-6. HPLC chromatogram of hexane fraction (PRF).**

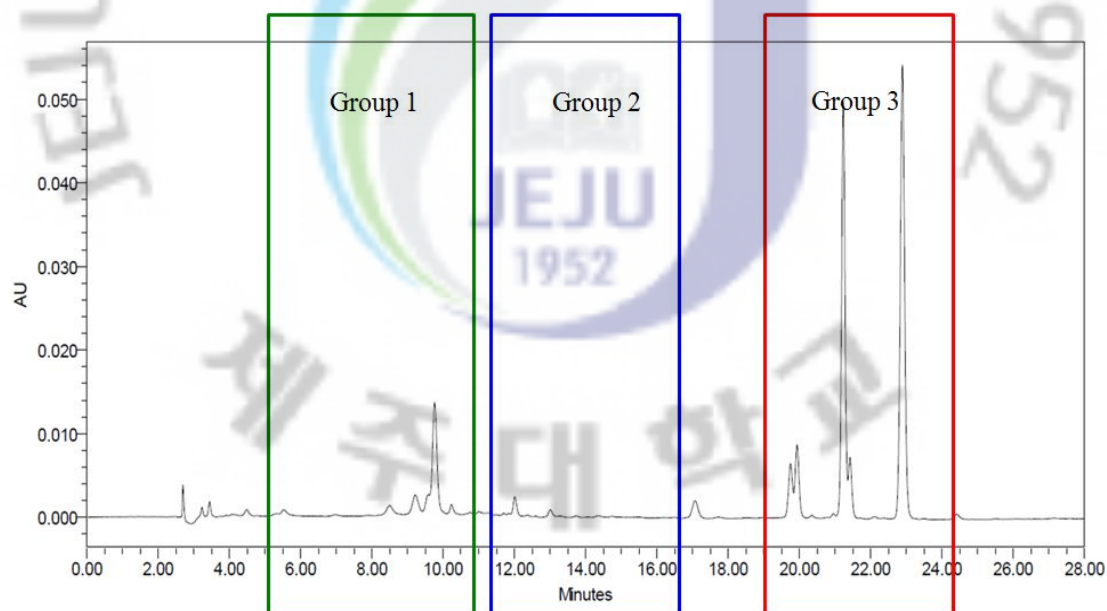
Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type;  
Group 3, PMFs type.





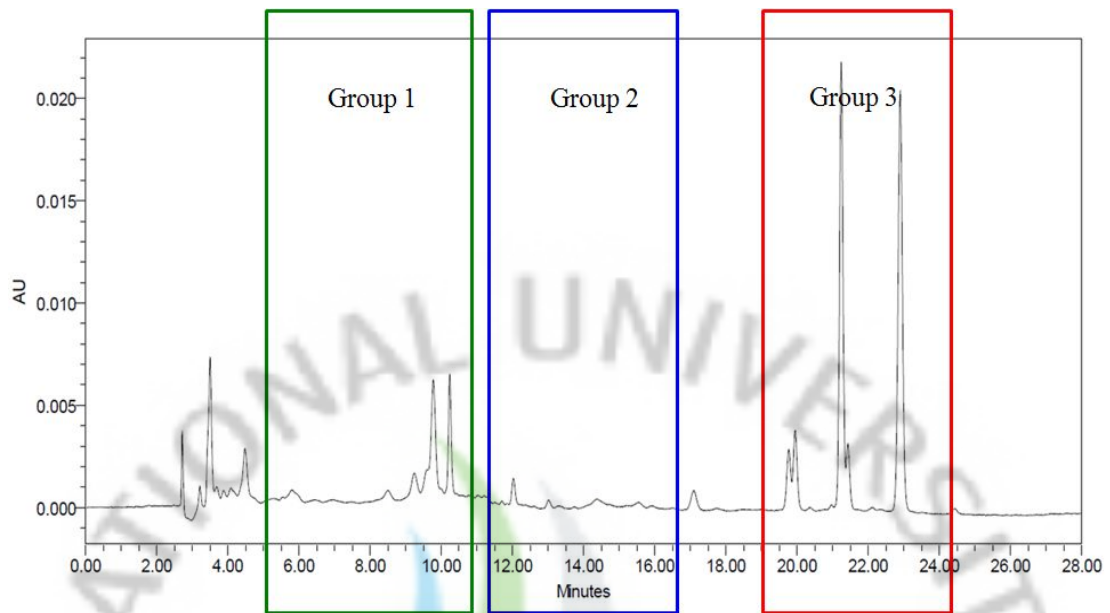
**Fig. 1-7. HPLC chromatogram of CHCl<sub>3</sub> fraction.**

Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type;  
Group 3, PMFs type.



**Fig. 1-8. HPLC chromatogram of EtOAc fraction.**

Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type;  
Group 3, PMFs type type.



**Fig 1-9. HPLC chromatogram of n-BuOH fraction.**

Group 1, flavonoid glycoside type; Group 2, flavonoid aglycone type;  
Group 3, PMFs type.

Table 1-4. Flavonoid contents extracted by n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH and hot water.

Standard	Flavonoid contents (mg/g)									
	n-Hexane (PRF)		CHCl <sub>3</sub>		EtOAc		n-BuOH		H <sub>2</sub> O	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Rutin	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Naringin	ND	-	ND	-	118.2	3.1	42.3	14.1	298.7	1.0
Hesperidin	ND	-	ND	-	7.3	24.7	25.9	17.3	142.0	25.0
Quercetin	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Naringenin	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Hesperetin	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Sinensetin	3.4	1.7	35.5	1.2	4.1	25.8	1.5	16.6	2.2	0.7
Nobiletin	214.4	0.7	259.4	0.8	29.1	0.4	10.4	0.0	16.8	1.0
Tangeretin	540.4	0.3	284.6	0.8	31.9	0.2	9.8	0.5	13.5	1.2
Extract yield (%)	0.15		0.31		0.64		0.77		-	
PMFs (%)	75.8		58.0		6.5		2.1		3.2	
Flavonoid (%)	75.8		58.0		19.1		9.0		47.3	

Mean values were calculated from three repeated experiments. RSD represents relative standard deviation (%) and ND means not detected.

### 3-2. PRF 중의 PMFs 분리

PMFs를 분리하기 위하여 진굴 건조과피 1.5 kg을 사용하여 플라보노이드 함량분석과 동일한 방법으로 열수 추출을 수행하였다. 열수 추출액은 원심분리기를 사용하여 상층액을 분리하였고, 가장 높은 PMFs 함량을 보이는 PRF 제조를 위해 1 L n-hexane을 3회에 걸쳐 용매분획하였다. 얻어진 상층액을 회전농축기를 사용하여 60°C 에서 농축하여 2.5 g의 PRF을 얻었다. PRF는 MeOH:EtOAc(1:1, v/v) 용매로 용해한 후, 테프론(PTFE) 주사기 필터로 여과하여 PMFs 분리를 위한 시료로 사용하였다. 이 분획물은 Semi-prep LC와 분취용 컬럼을 사용하여 3개의 PMFs 표준물질을 포함한 6개의 PMFs와 2개의 hydroxylated PMFs을 분리하였다(Fig. 1-10). 분리된 PMFs의 화학구조는  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)과  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)을 이용하여 확인하였다.

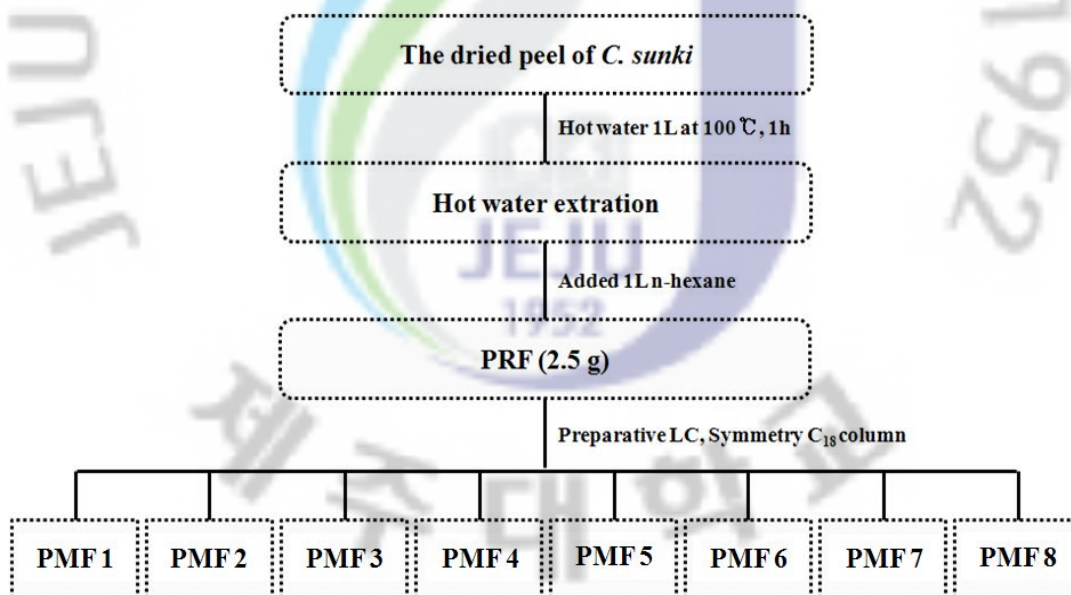


Fig. 1-10. Schematic diagram for isolation of eight PMFs.

Eight PMFs were obtained from the peels of *C. sunki* by hot-water extraction and subsequent fractionation with n-hexane, and then six PMFs and two demethylated PMFs were isolated by semi-prep LC.

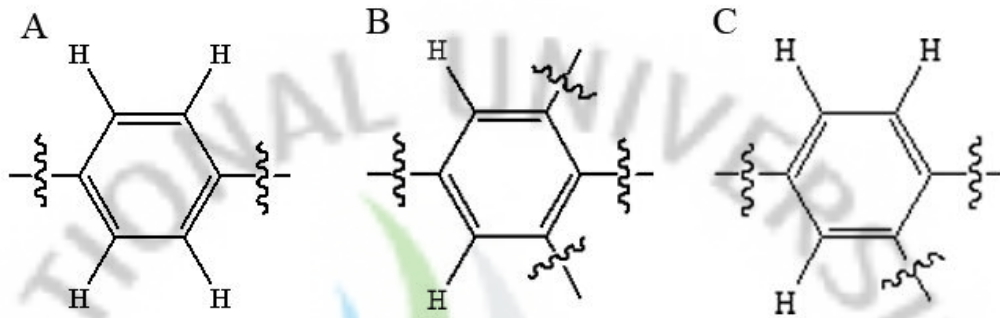
### 3-3. PMFs의 화학구조 확인

진굴과피로부터 분리된 8개 PMFs의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 에 스펙트럼 데이터를 Table 1-5와 1-6에 나타내었다. 또한 각 화합물의 구조와 분취량을 Fig. 1-28에 나타내었다.

먼저 PMF 1에 대한  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼을 살펴보면, 3.97, 3.93, 3.89 ppm에서 적분 값이 3인 3개의 단일 피크(singlet)가 확인되었고, 이는 페닐 고리에 메톡시기가 결합된 PMFs인 것으로 예측되었다. 또한 7.85(2H, d,  $J=8.5$  Hz)과 7.02(2H, d,  $J=8.5$  Hz) ppm에서 각각 ortho-coupling이 확인되는 것으로 보아 Fig. 1-11의 A와 같은 구조의 수소가 결합된 페닐 화합물인 것으로 예측되었고, 6.58(1H, d,  $J=2.4$  Hz)과 6.39(1H, d,  $J=2.4$  Hz) ppm에서 meta-coupling이 일어나는 것으로 보아 B와 같은 구조의 페닐 화합물로 이루어진 PMFs일 것이라고 예측되었다. 또한 6.39 ppm에서 다른 수소와 couplig하지 않는 단일 올레핀(singlet olefin) 수소 피크가 관찰되는 것으로 보아 메틴(-CH-) 수소가 있다는 것을 예측할 수 있었다(Fig. 1-12). PMF 1의  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 177.9 ppm에서 1개의 카르보닐기와 160.1 ~ 162.2 ppm은 산소가 치환된 이중결합이 존재하는 것으로 예측되었고, 127.8과 114.6 ppm에서는 Fig. 1-11의 A 구조의 4개의 탄소가 각각 겹쳐져 2개의 피크가 관찰되었다. 또한 56.6, 56.0, 55.7 ppm에서 3개의 메톡시기가 존재하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1-13). 이러한 결과들을 종합하여 이 화합물은 5,7,4'-trimethoxyflavone으로 예측하였고, 선행 연구와도 일치함을 확인하였다 (Machida and Osawa, 1989).

분리된 PMF 2의  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼을 살펴보면, 4.02, 3.98, 3.96, 3.84 ppm에서 4개의 단일 피크가 확인되었고, 7.87(2H, d,  $J=9.0$  Hz)와 7.01(2H, d,  $J=9.0$  Hz) ppm에서 ortho-coupling이 확인되는 것으로 보아 Fig. 1-11의 A와 같은 구조의 수소가 결합된 페닐 화합물 구조임을 예측하였다. 그리고 2 개의 단일 올레핀 수소 피크(6.51, 6.41 ppm)는 다른 수소 피크와 couplig 하지 않는 메틴 수소가 있는 것을 예측할 수 있었다(Fig. 1-14).  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 177.9 ppm에서 1개의 카르보닐기와 산소가 치환된 5개의 이중 결합된 탄소가 130.5 ~ 164.1 ppm에서 관찰되었다. 또한 PMF 1와 마찬가지로, 127.8과 114.5 ppm에서

4개의 탄소가 각각 겹쳐진 2개의 피크가 관찰되었고, 메톡시기 피크가 61.7, 56.7, 56.4, 55.6 ppm에서 관찰되었다(Fig. 1-15). 이러한 결과들을 종합하여 이 화합물은 Tetra-O-methylisotellarein으로 동정되었다(Machida and Osawa, 1989).



**Fig. 1-11. Chemical structure of PMFs deduced from  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrometry.**

PMF 3의  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼을 살펴보면, 7.50(1H, dd,  $J=8.8, 2.2$  Hz), 7.33(H, d,  $J=2.2$  Hz), 6.96(1H, d,  $J=8.8$  Hz) ppm에서 ortho, meta-coupling이 확인되는 것으로 보아, Fig. 1-11의 C와 같은 구조를 갖는 페닐 화합물이 있는 것으로 예측되었고, 3.97, 3.95, 3.93, 3.92, 3.87 ppm에서 5개의 메톡시기가 있는 것으로 관찰되었다. 또한 2 개의 단일 올레핀 수소 피크(6.86, 6.51 ppm)가 관찰되었다(Fig. 1-16).  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 178.0 ppm에서 카르보닐기 피크와 61.8, 61.2, 56.1, 55.9, 55.8 ppm에서 메톡시기 피크가 관찰되었다. 또한 140.2 ~ 158.0 ppm에서 산소가 치환된 이중결합 탄소가 관찰되었고, 93.4 ppm에서는 산소가 치환된 이중결합 사이에 탄소가 존재하는 것으로 예측하였다(Fig. 1-17). 따라서 PMF 3은 sinensetin인 것으로 동정하였고, 선행연구와도 일치하였다(Machida and Osawa, 1989).

PMF 4인 경우,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서, 6개의 메톡시기 피크(4.10, 4.02, 3.97, 3.96, 3.95, 3.95)가 관찰되었고, 7.58(1H, dd,  $J=8.6, 2.0$  Hz), 7.41(1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.00(1H, d,  $J=8.6$  Hz) ppm과 같이 ortho, meta-coupling이 관찰되는 것으

로 보아, Fig. 1-11의 C의 구조로 유추하였다. 또한 6.61 ppm에서 couplig하지 않는 1개의 올레핀 수소 피크를 확인하였고(Fig. 1-18),  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 177.5 ppm에서 카르보닐기 피크와 62.4, 62.1, 61.9, 61.7, 56.3, 56.2 ppm에서 6개의 메톡시기 피크가 관찰되었다(Fig. 1-19). 그리고 이 화합물을 선행연구와 비교해 본 결과 표준물질로 사용된 nobiletin인 것으로 확인되었다(Raman et al., 2005).

PMF 5인 경우,  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서, 5개의 메톡시기 피크(4.09, 4.01, 3.94, 3.94, 3.88 ppm)가 관찰되었고, 7.88과 7.02에서 couplig 상수가 9.0 Hz인 ortho-coupling을 확인하였고, 또한 올레핀 수소의 단일 피크(6.59 ppm)가 관찰되었다(Fig. 1-20).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼과 동일한 5개의 메톡시기 피크(62.2, 62.0, 61.8, 61.6, 55.5 ppm)와 1개의 카르보닐기 피크(177.3 ppm)가 관찰되었고, 6개의 산소가 치환된 이중결합 탄소(138.0 ~ 161.1 ppm)가 관찰되었다(Fig. 1-21). 선행연구와 비교한 결과 PMF 5은 tangeretin으로 확인되었다(Raman et al., 2005).

PMF 6도 PMF 3과 유사한 경향의  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼을 나타내었다. 5개의 메톡시기 피크(4.02, 4.00, 3.98, 3.97, 3.97 ppm)가 관찰되었고, 7.59(1H, dd,  $J=8.6, 2.0$  Hz), 7.43(H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.01(H, d,  $J=8.6$  Hz) ppm과 두 개의 단일 피크로 보아 Fig. 1-11의 C와 같은 구조를 예측하였다(Fig. 1-22).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 178.1 ppm에서 카르보닐기 피크와 61.7, 56.8, 56.4, 56.3, 56.2 ppm에서 메톡시기의 피크가 관찰되었다. 또한 149.5 ~ 156.7 ppm에서 산소가 치환된 이중결합 탄소가 관찰되었고, 92.8 ppm에서는 산소가 치환된 이중결합 사이에 탄소가 있을 것으로 예측하였다(Fig. 1-23). PMF6의 NMR 스펙트럼을 선행연구와 비교해 본 결과 이 화합물은 sosinensetin인 것으로 확인되었다(Qizhen and Chen, 2010).

PMF 7은 4.12, 3.99(9H), 3.96 ppm에서 5개의 메톡시기와 12.55(1H, s) ppm에서 한 개의 히드록시기가 있는 것으로 예측되었다. 또한 7.61(1H, dd,  $J=8.7, 2.1$  Hz), 7.43(1H, d,  $J=2.1$  Hz), 7.02(1H, d,  $J=8.5$  Hz)와 6.62 ppm에서 단일 올레핀 수소가 관찰되었고, 대부분의 피크가 PMF 4와 아주 유사한 위치에서 관찰되었다(Fig. 1-24). 따라서 PMF 7은 PMF 4 구조에서 한 개의 메톡시기가 히드록시기로

치환된 PMFs일 것이라고 유추할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서도, 5개의 메톡시기(62.3, 62.3, 61.4, 56.4, 56.3 ppm)가 관찰되었고, 7개의 산소가 치환된 이중 결합 한 개의 카르보닐기 피크(183.3 ppm)가 관찰되었다(Fig. 1-25). PMF 7의 성분 역시 선행연구와 비교해 본 결과, 5-demethylnobiletin인 것으로 동정되었다(Li et al., 2006).

PMF 8 또한  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 한 개의 단일 피크가 12.59 ppm에서 관찰된 것을 제외하고는 PMF 5에서 관찰된 대부분의 피크와 유사한 경향을 보였다. 또한 PMF 5보다 한 개가 적은 메톡시기 피크(4.12, 3.99, 3.96, 3.91 ppm)가 관찰되었고, 7.92(2H, dd,  $J=9.0, 2.2$  Hz)와 7.06(2H, dd,  $J=9.0, 2.2$  Hz) ppm을 보이는 것으로 보아 Fig. 1-11의 A 구조로 예측할 수 있었다(Fig. 1-26).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서도 메톡시기 피크는 PMF 5보다 한 개가 적은 4개의 피크가 관찰되었다. 또한 한 개의 카르보닐기 피크(183.2 ppm)가 관찰되는 것으로 보아 PMF 7과 같이 한 개의 메톡시기가 히드록시기로 치환된 PMFs일 것으로 유추하였고(Fig. 1-27), 선행연구와 비교해 본 결과 이 성분은 5-demethyltangeretin인 것으로 확인되었다(Li et al., 2006).

이러한 결과로부터 PRF 분획물에서 8개의 PMFs 화합물을 분리 및 동정하였고, NMR 스펙트럼을 문헌을 비교한 결과 3개 이상의 메톡시기가 결합된 형태의 PMFs가 존재함을 확인하였다. 그리고 이러한 결과로부터 sinensetin, nobiletin, tangeretin 외에도 PMF 1, PMF 2, PMF 6, PMF 7, PMF 8이 PRF 내에 함유되어 있음을 확인하였다(Fig. 1-20).



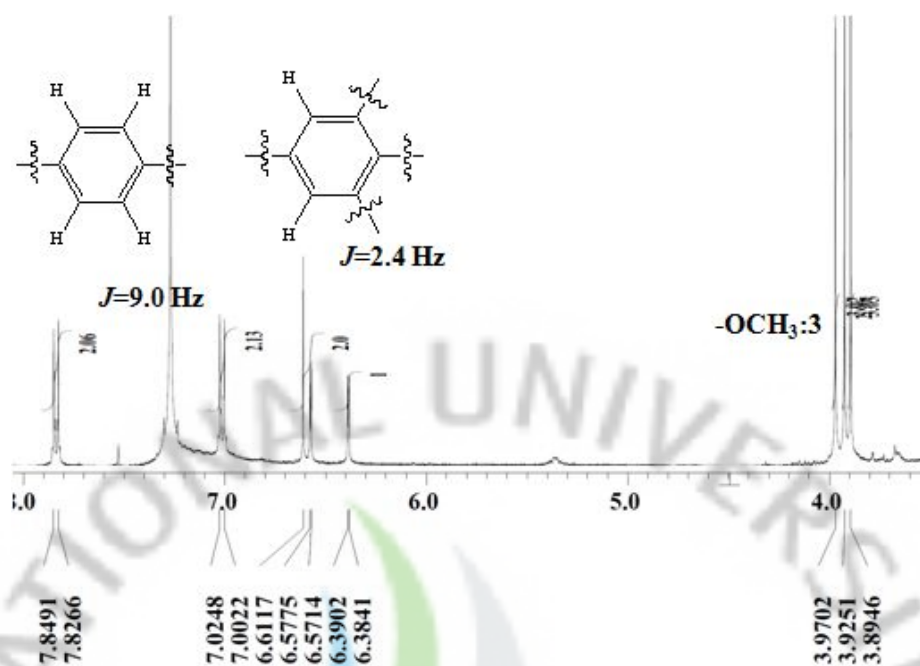


Fig. 1-12.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of PMF 1 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

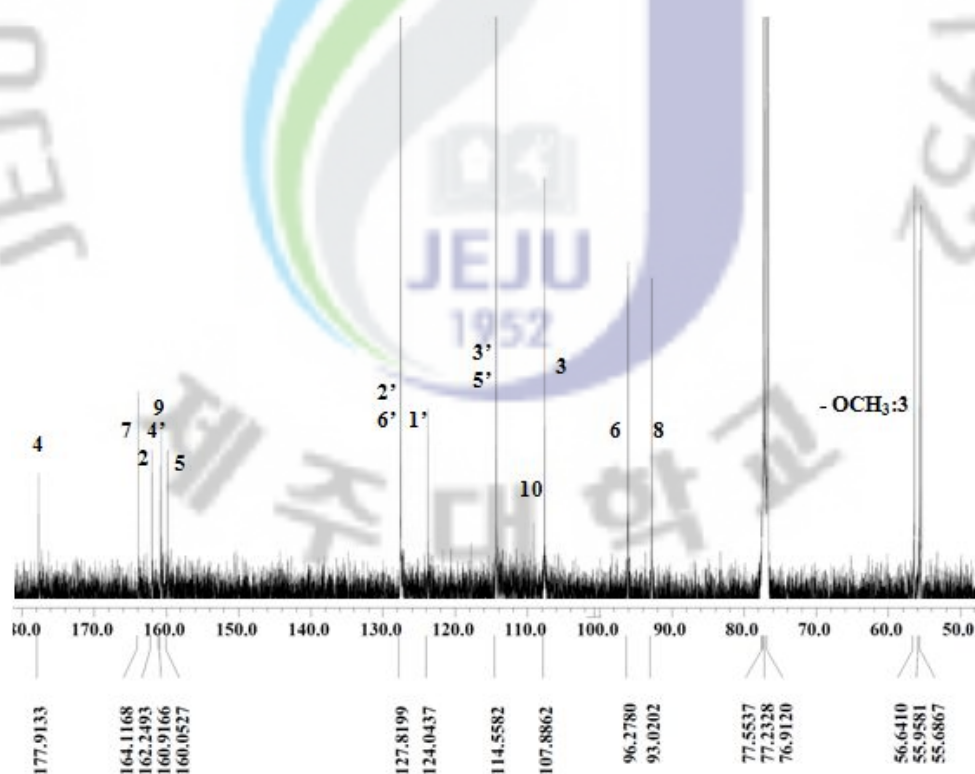


Fig. 1-13.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of PMF 1 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

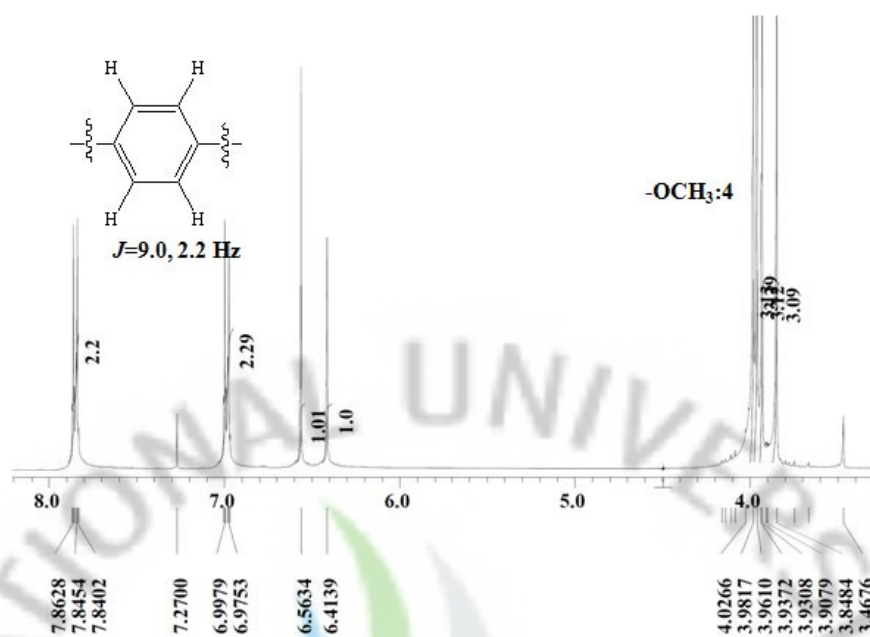


Fig. 1-14.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PMF 2 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

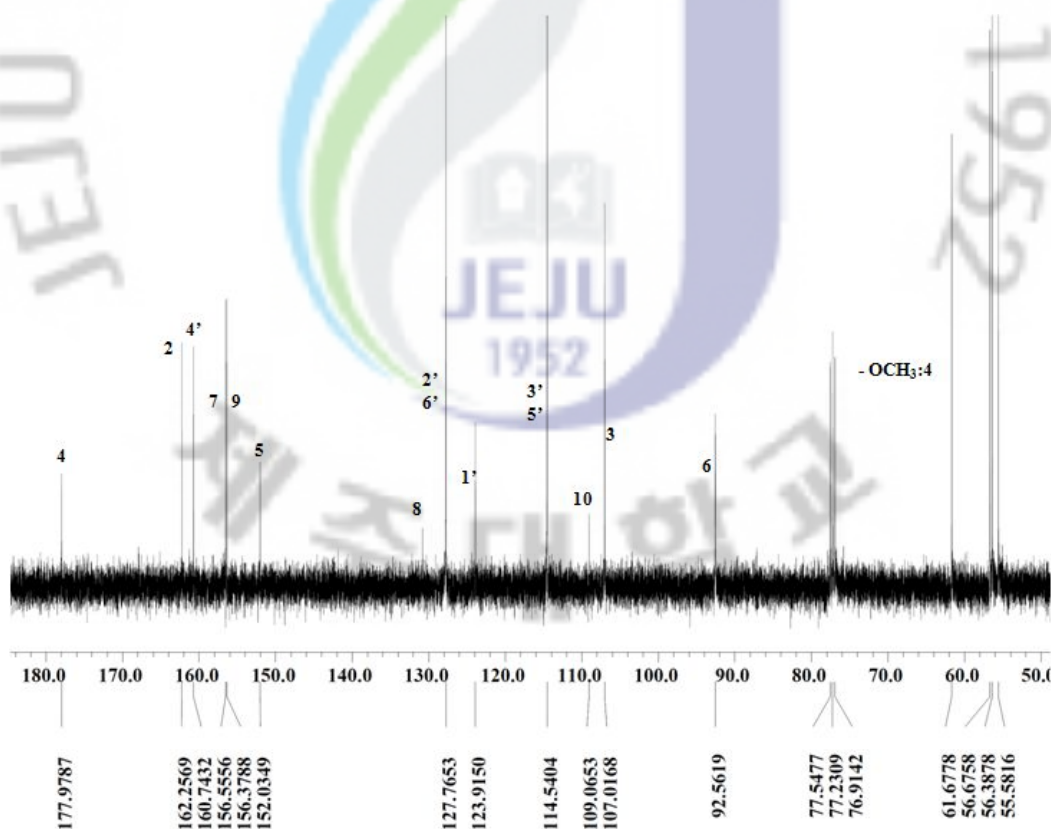


Fig. 1-15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PMF 2 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

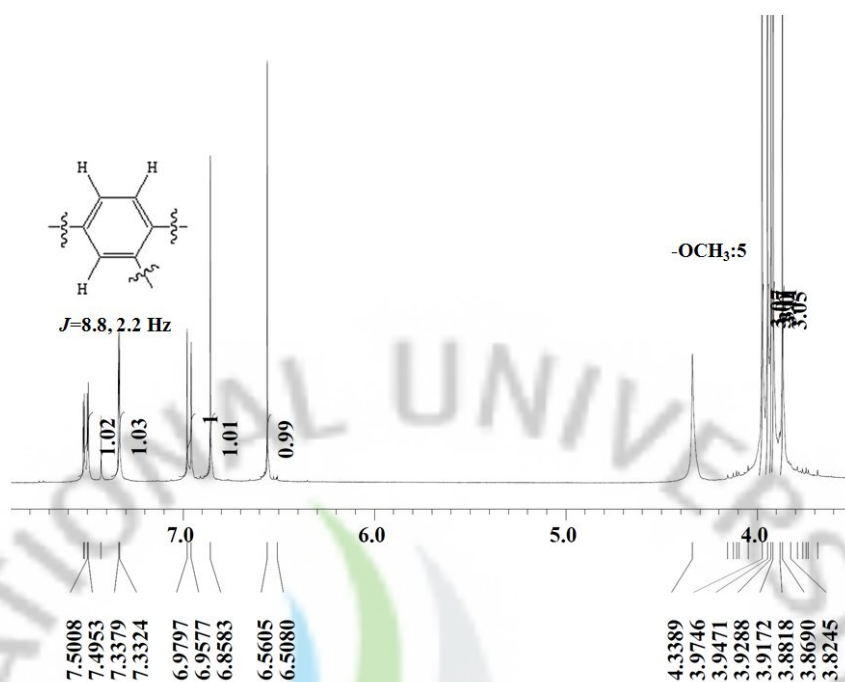


Fig. 1-16.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PMF 3 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

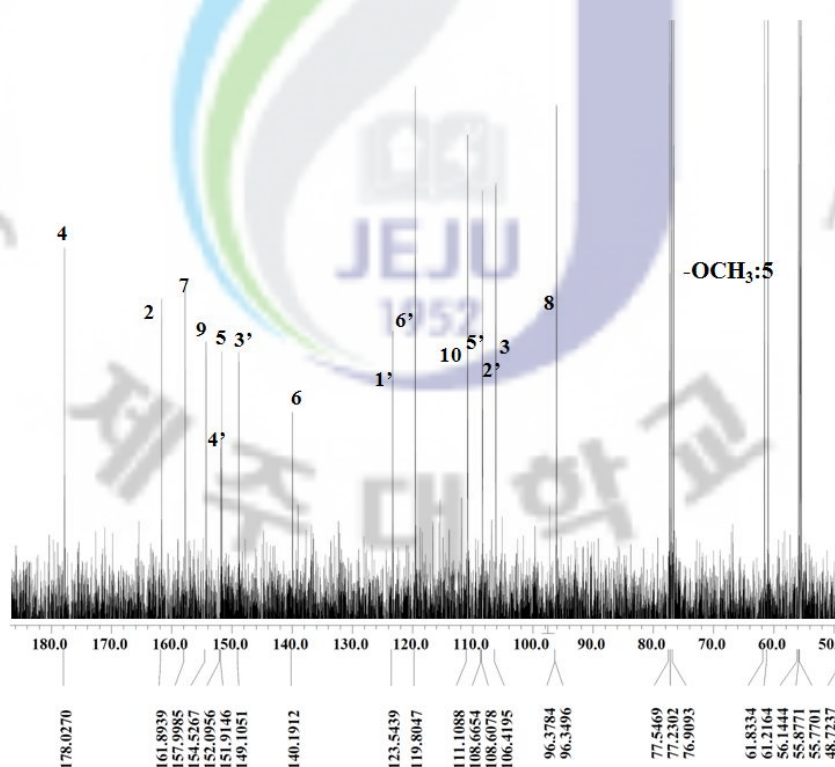


Fig. 1-17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PMF 3 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

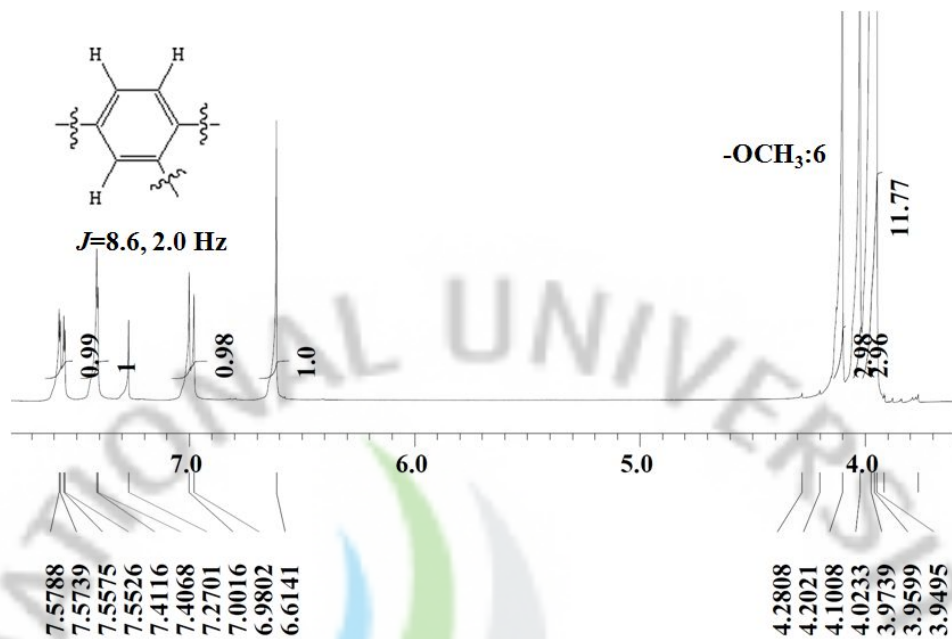


Fig. 1-18.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of PMF 4 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

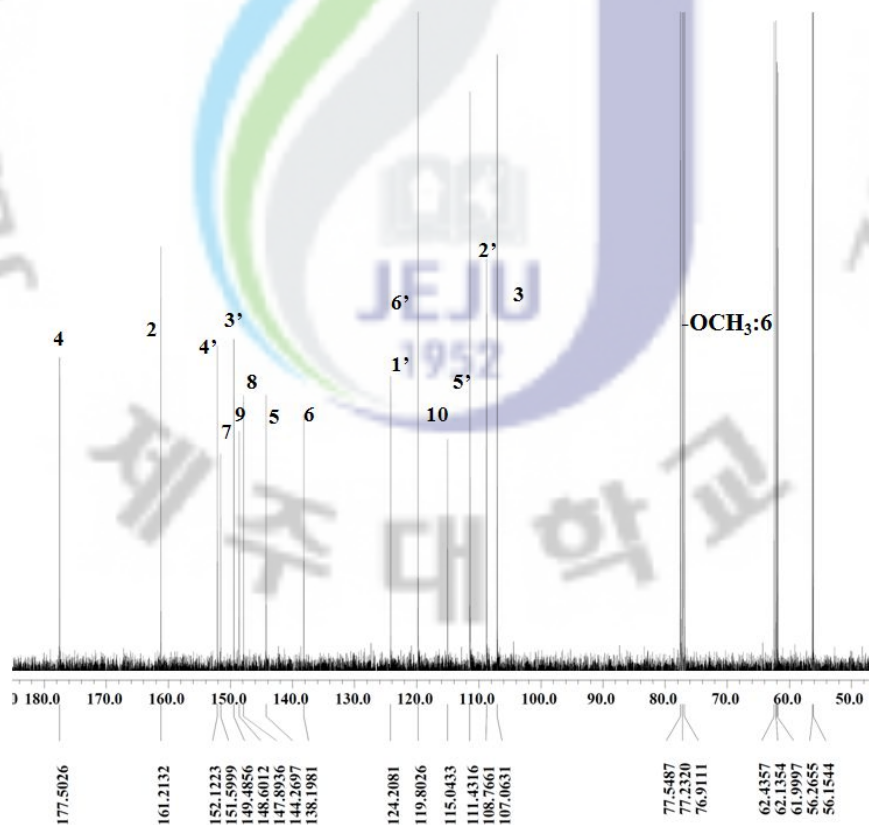


Fig. 1-19.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of PMF 4 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

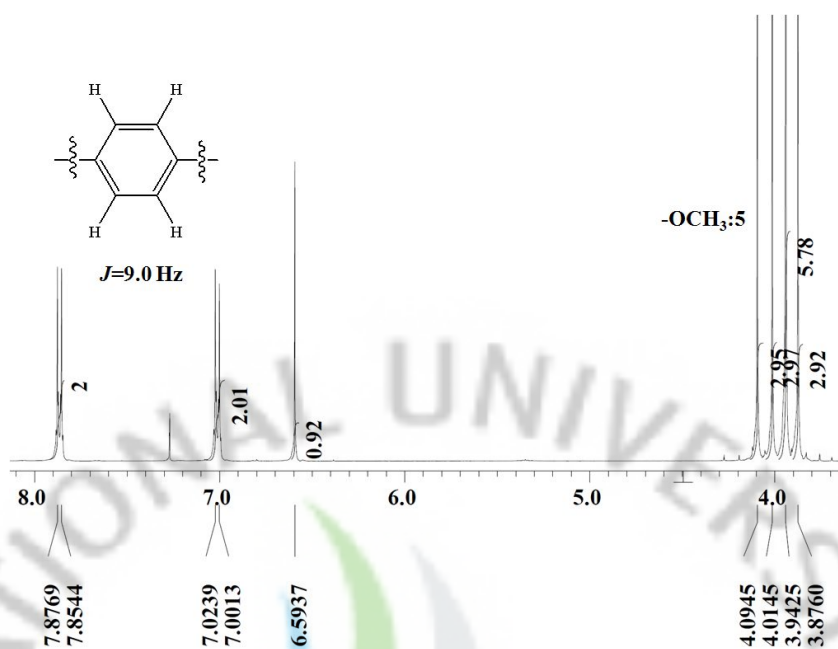


Fig. 1-20.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of PMF 5 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

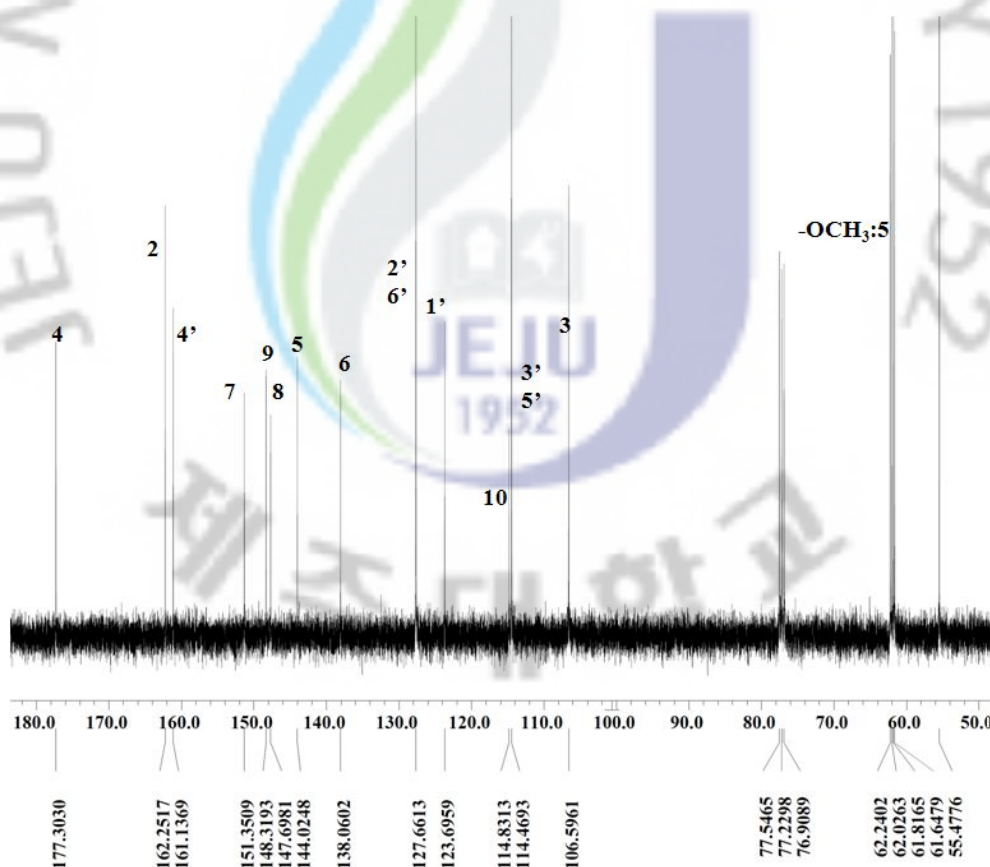


Fig. 1-21.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of PMF 5 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

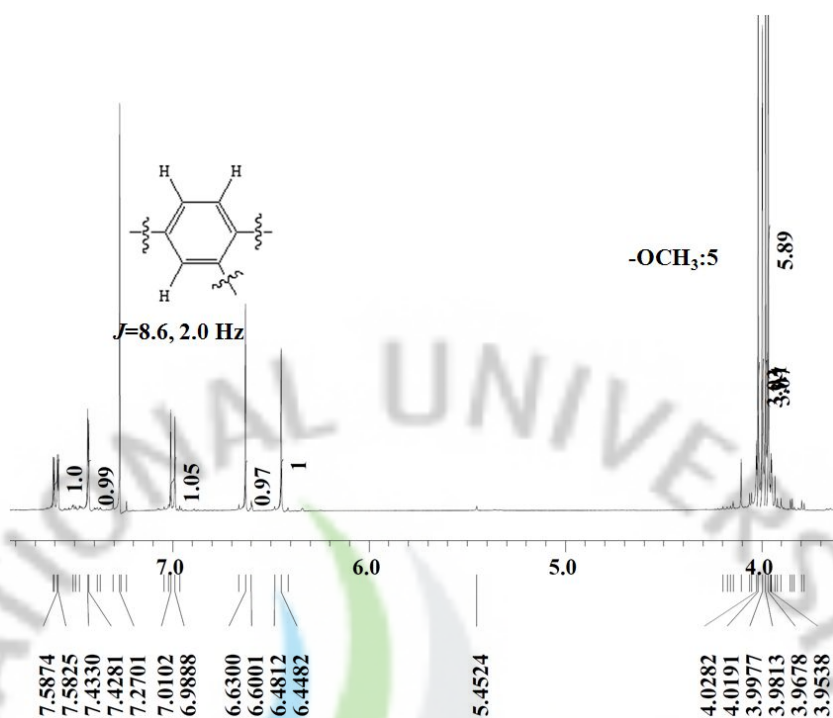


Fig. 1-22.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PMF 6 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

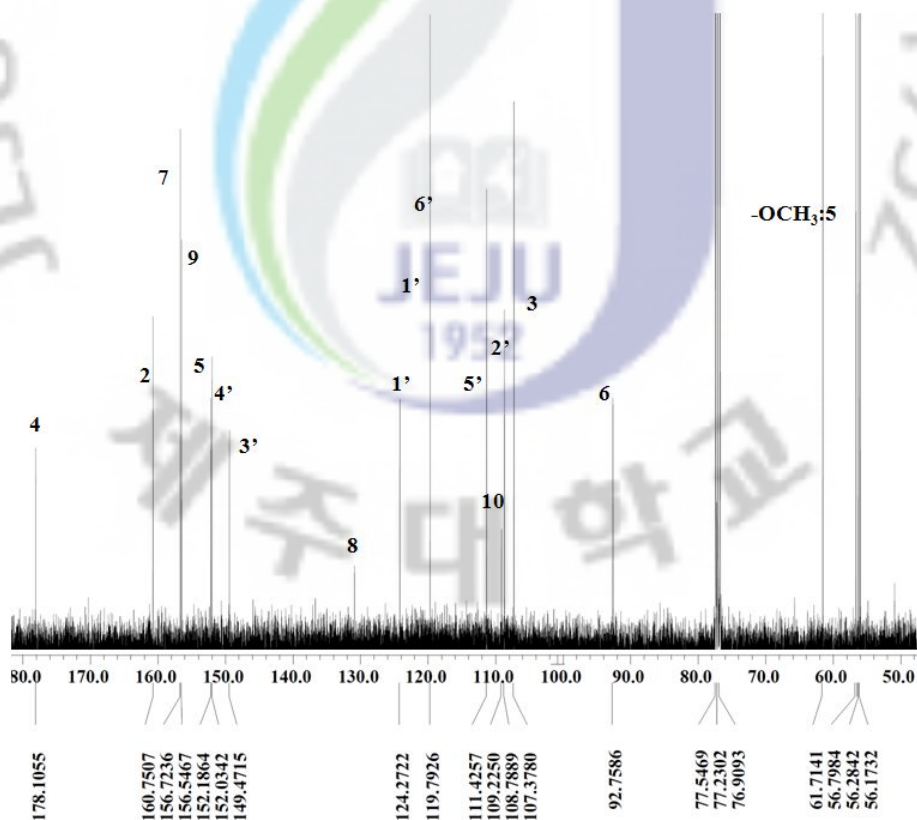


Fig. 1-23.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PMF 6 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

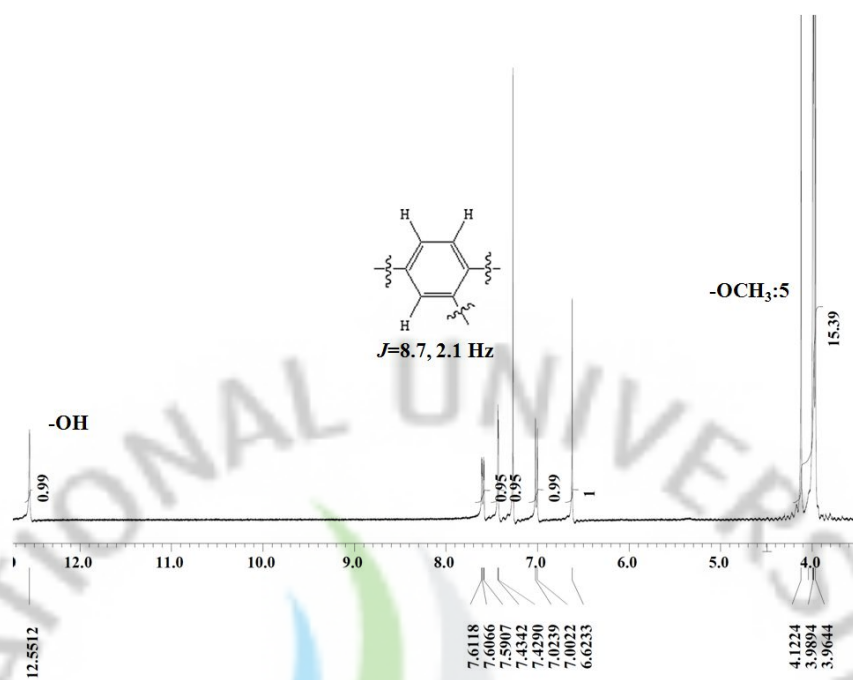


Fig. 1-24.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PMF 7 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

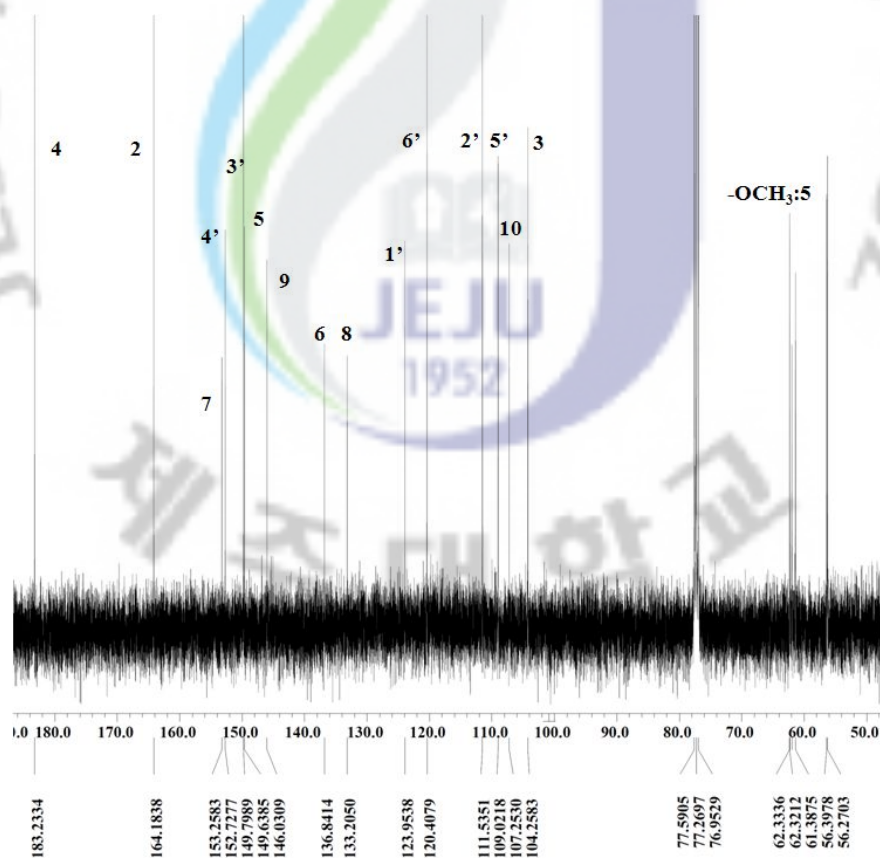


Fig. 1-25.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PMF 7 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

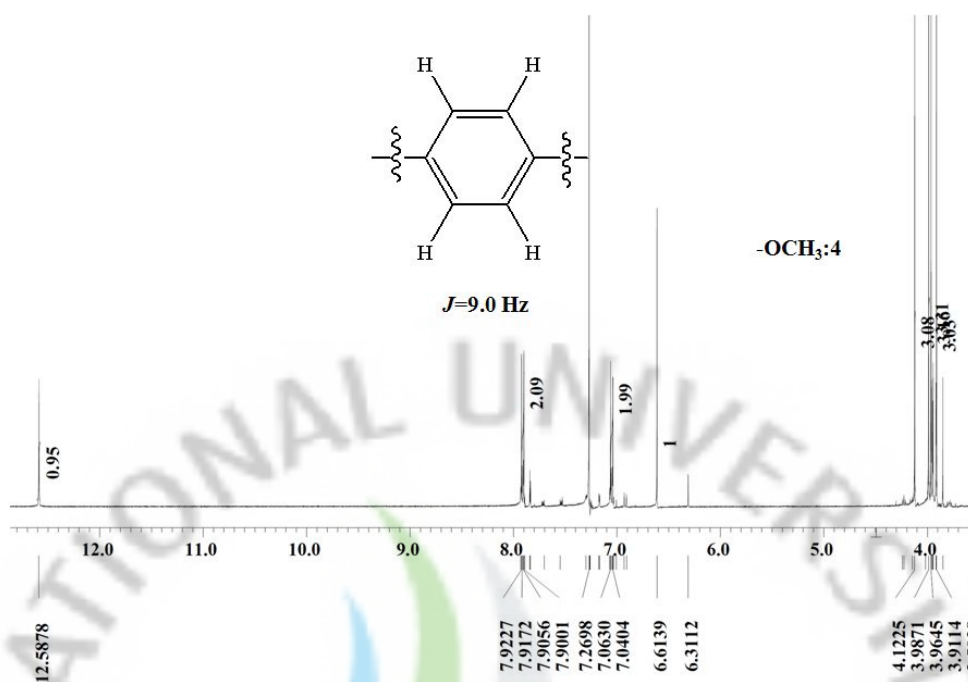


Fig. 1-26.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PMF 8 in  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

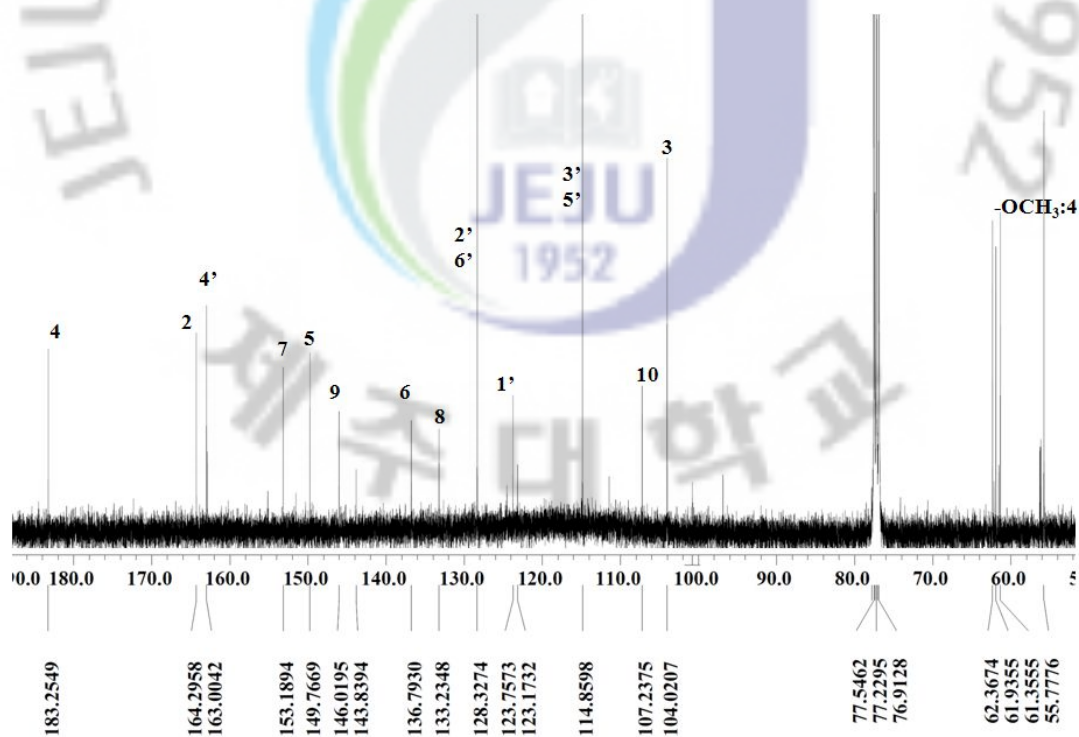
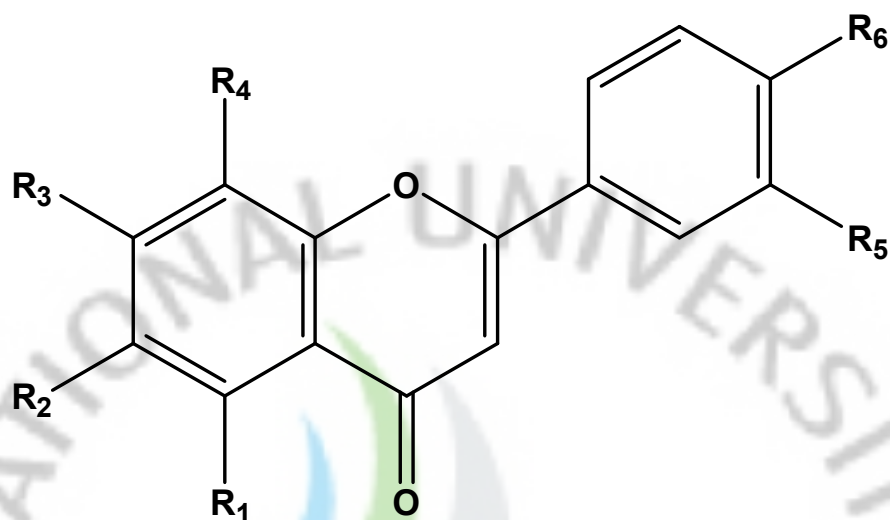


Fig. 1-27.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PMF 8 in  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).





PMFs	Compound name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
PMF 1 (5.8 mg)	5,7,4'-trimethoxyflavone	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>
PMF 2 (87.5 mg)	Tetra-O-methylisotellarein	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
PMF 3 (8.5 mg)	Sinensetin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
PMF 4 (474.1 mg)	Nobiletin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
PMF 5 (1124.9 mg)	Tangeretin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
PMF 6 (17.6 mg)	Isosinensetin	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
PMF 7 (13.6 mg)	5-Demethylnobiletin	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
PMF 8 (57.1 mg)	5-Demethyltangeretin	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Fig. 1-28. Chemical structures of eight PMFs isolated from PRF (n-hexane fraction).** Six PMFs and two demethylated PMFs were identified based on their <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra. Each PMFs were confirmed by comparison of the NMR spectral data with those reported in the literature.

Table 1-5.  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of eight PMFs ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm).

PMFs	-OH	Ar-H	-OCH <sub>3</sub>
PMF 1		7.84(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 7.02(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 6.61(s, 1H), 6.58(d, $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 6.39(d, $J=2.4\text{Hz}$ , 1H)	3.97(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.89(s, 3H)
PMF 2		7.87(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 7.01(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 6.56(s, 1H), 6.41(s, 1H)	4.02(s, 3H), 3.98(s, 3H), 3.96(s, 3H), 3.84(s, 3H)
PMF 3		7.50(dd, $J=8.8$ , 2.2Hz, 1H), 7.33(d, $J=2.2\text{Hz}$ , 1H), 6.96(d, $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 6.86(s, 1H), 6.51(s, 1H)	3.97(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.92(s, 3H), 3.87(s, 3H)
PMF 4		7.58(dd, $J=8.6$ , 2.0Hz, 1H), 7.41(d, $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.00(d, $J=8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.61(s, 1H)	4.10(s, 3H), 4.02(s, 3H), 3.97(s, 3H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 6H)
PMF 5		7.88(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 7.02(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2H), 6.59(s, 1H)	4.09(s, 3H), 4.01(s, 3H), 3.94(s, 6H), 3.88(s, 3H)
PMF 6		7.59(dd, $J=8.6$ , 2.0Hz, 1H), 7.43(d, $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.01(d, $J=8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.63(s, 1H), 6.48(s, 1H)	4.03(s, 3H), 4.00(s, 3H), 3.98(s, 3H), 3.95(s, 6H)
PMF 7	12.55(s,1H)	7.61(dd, $J=8.7$ , 2.1Hz, 1H), 7.43(d, $J=2.1\text{Hz}$ , 1H), 7.02(d, $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 6.62(s, 1H)	4.12(s, 3H), 3.99(s, 9H), 3.96(s, 3H)
PMF 8	12.59(s,1H)	7.92(dd, $J=9.0\text{Hz}$ , 2.2Hz, 2H), 7.06(d, $J=9.0\text{Hz}$ , 2.2Hz 2H), 6.61(s, 1H)	4.12(s, 3H), 3.99(s, 3H), 3.96(s, 3H), 3.91(s, 3H)

$J$ , coupling constants; s, singlet; d, doublet; dd, double doublet.

Table 1-6.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra data for eight PMFs ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm).

PMFs	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>
PMF 1	162.2	107.9	177.9	160.1	96.3	164.1	93.0	160.9	107.9
PMF 2	162.3	107.7	177.9	152.0	92.6	156.6	130.5	156.4	109.1
PMF 3	161.9	106.4	178.0	152.0	140.2	158.0	93.4	154.5	111.1
PMF 4	161.2	107.1	177.5	144.3	138.2	151.6	147.9	148.6	115.0
PMF 5	162.3	106.6	177.3	144.0	138.0	151.3	148.3	147.7	114.8
PMF 6	160.8	107.4	178.1	152.2	92.8	156.7	130.8	156.5	109.2
PMF 7	164.3	104.0	183.3	149.8	136.8	153.2	133.2	146.2	107.2
PMF 8	164.2	104.3	183.2	149.6	136.8	153.2	133.2	146.0	107.3

PMFs	C <sub>1</sub> '	C <sub>2</sub> '	C <sub>3</sub> '	C <sub>4</sub> '	C <sub>5</sub> '	C <sub>6</sub> '	-OCH <sub>3</sub>					
							C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>3</sub> '	C <sub>4</sub> '
PMF 1	124.0	127.8	114.6	161.0	114.6	127.8	56.6	-	56.0	-	-	55.7
PMF 2	123.9	127.8	114.5	160.7	114.5	127.8	56.7	-	56.4	61.7	-	55.6
PMF 3	123.5	108.6	149.1	152.1	108.7	119.8	61.8	61.2	56.1	-	55.9	55.8
PMF 4	124.2	108.8	149.5	152.1	111.4	119.8	62.4	62.1	61.9	61.7	56.3	56.2
PMF 5	123.8	127.7	114.5	161.1	114.5	127.7	61.6	62.2	62.0	61.8	-	55.5
PMF 6	124.3	108.8	149.5	152.0	111.4	119.8	57.1	-	56.8	61.7	65.3	56.2
PMF 7	123.8	128.3	114.9	163.0	114.9	128.3	-	61.4	62.4	61.9	-	55.8
PMF 8	124.0	111.5	149.8	152.7	109.0	120.4	-	61.4	62.3	62.3	56.4	56.3

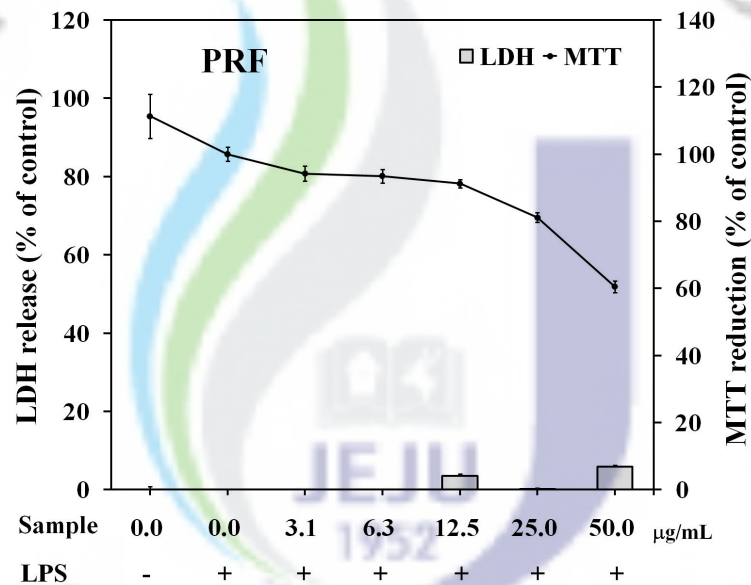
### 3-4. DPPH 라디칼 소거 활성

PRF와 그로부터 분리된 8개의 PMFs에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정  
한 결과 측정된 농도범위에서 PRF를 비롯한 8개의 PMFs에서의 DPPH 라디칼  
소거능은 관찰되지 않았다(data not shown).

### 3-5. NO 생성 저해 활성

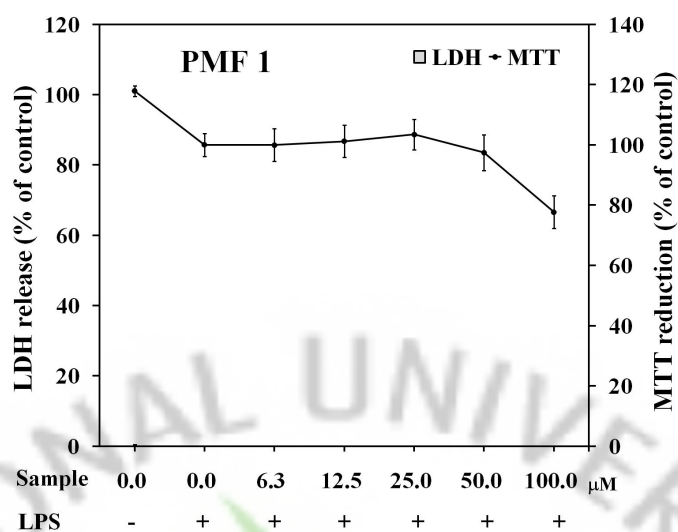
PRF를 비롯한 8개의 PMFs의 적정 처리 농도를 결정하기 위하여 MTT assay  
와 LDH assay를 실시하였다. RAW 264.7 대식세포에 시료와 LPS를 처리하여  
PRF와 8개의 PMFs에 대한 세포독성을 확인하였다(Fig 1-29 ~ 1-37). PRF인 경  
우, 0, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리하였고, 분리된 8개의 PMFs  
는 0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{M}$ 의 동일한 농도로 세포에 처리하였다. 그 결  
과 대부분의 시료에서 세포독성은 나타나지 않았다. PRF, PMF 7, PMF 8에서 다  
소의 세포독성이 확인되었으나, 실험에 큰 영향을 미치지 않는 미미한 정도였다.  
따라서 세포독성 분석에서 사용한 동일한 조건의 시료를 세포에 처리하여 PRF와  
그로부터 분리된 8개의 PMFs에 대한 NO 생성 억제효과를 관찰하였다(Fig. 1-38  
~ 1-46). DPPH 라디칼 소거능과는 반대로, 대부분의 PMFs 화합물들은 NO 생성  
을 감소시켰다. PRF는 LPS를 처리한 양성 대조군에 비하여 NO의 생성을 농도  
의존적으로 감소시켰고, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 음성 대조군 수준까지 NO 생성  
을 감소시키는 것으로 조사되었다(Fig. 1-38). PMF 1인 경우 다른 PMFs에 비하  
여 가장 뛰어난 NO 생성 저해능을 나타내었다. 100  $\mu\text{M}$  농도로 PMF 1을 처리  
한 결과 97.6%의 NO 생성 저해율을 나타내었다(Fig. 1-39). 하지만 다른 PMFs와  
달리 PMF 2의 NO 생성 억제 효과는 관찰되지 않았다(Fig. 1-40). 또 PMF 3과  
PMF 6은 각각 43.9%와 54.6% 수준의 NO 생성 소거능을 보였다(Fig. 1-41, 1-36).  
PMF 4는 73.7% 수준의 NO 생성 소거능을 보였고(Fig 1-42), MTT 분석에서 50  
 $\mu\text{M}$  농도에서 세포에 영향을 미치는 것으로 나타났으나, LDH 분석에서는 세포  
독성이 나타나지 않는 것으로 보아 세포 독성보다는 세포 증식을 억제하는 효과  
를 나타내는 것으로 추정된다(Fig. 1-33). PMF 5는 PMF 4와 비슷한 수준의 NO  
생성 소거능을 보였다(Fig. 1-43). 또한 PMF 5는 MTT와 LDH 분석에서 약간의

세포 독성이 관찰되었으나 실험에 영향을 미치지 않는 미미한 수준이었다(Fig. 1-36). 그리고 PMF 7과 PMF 8은 메톡시기가 히드록시기로 치환된 PMFs로 MTT 분석에서 다른 PMFs에 비해 세포에 미치는 영향이 컸으나, LDH 분석 결과 세포독성은 나타나지 않았고(Fig 1-36, 1-37), NO 생성도 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 1-45, 1-46).



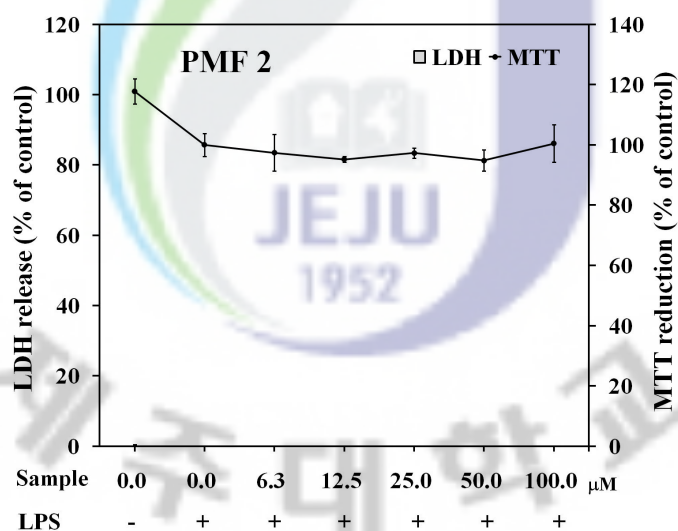
**Fig. 1-29. Cytotoxicity of PRF on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL) of PRF for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean±S.D. of determination values.



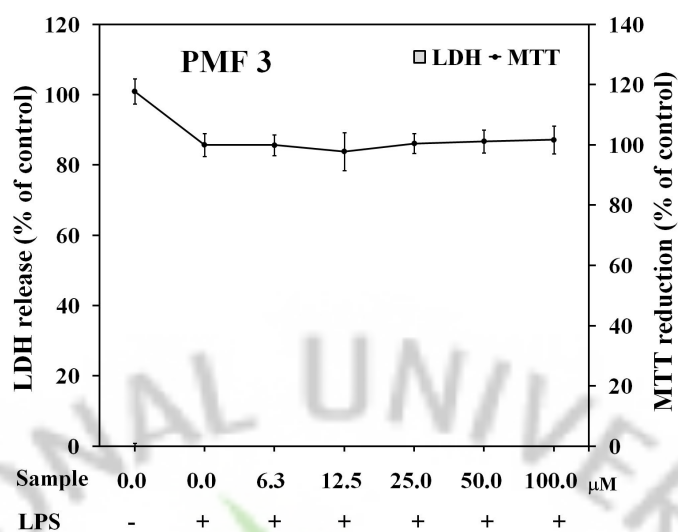
**Fig. 1-30. Cytotoxicity of PMF 1 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 1 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



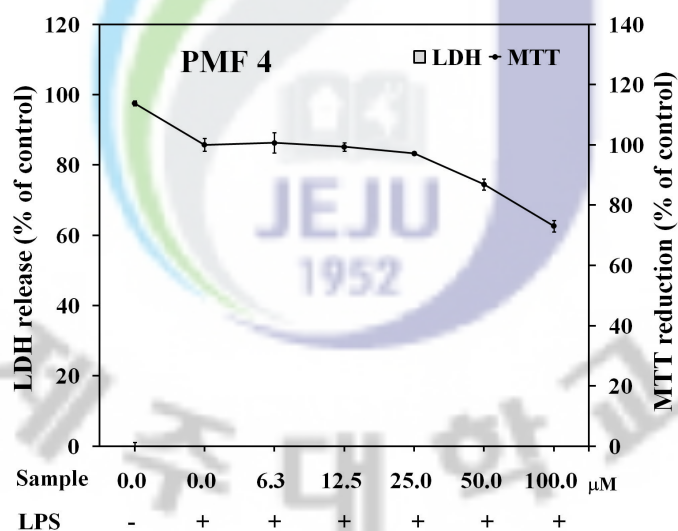
**Fig. 1-31. Cytotoxicity of PMF 2 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 2 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



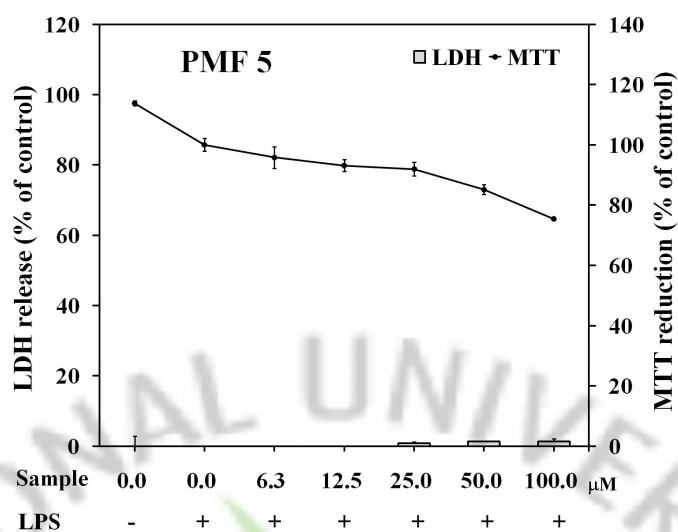
**Fig. 1-32. Cytotoxicity of PMF 3 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 3 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



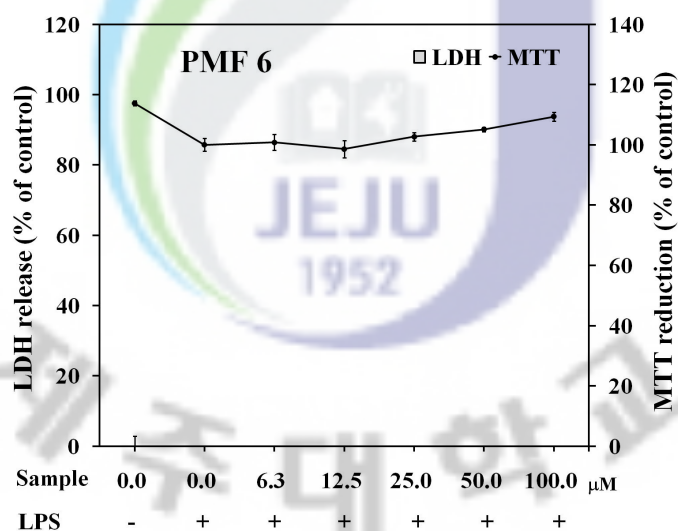
**Fig. 1-33. Cytotoxicity of PMF 4 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 4 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 1-34. Cytotoxicity of PMF 5 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

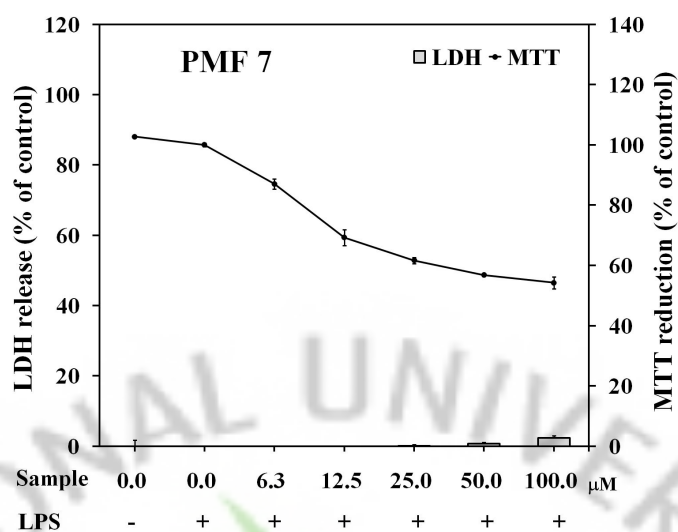
Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 5 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 1-35. Cytotoxicity of PMF 6 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

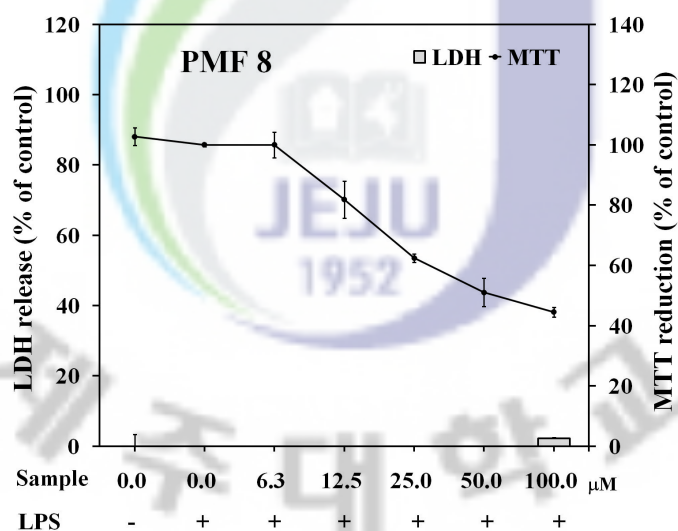
Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 6 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.





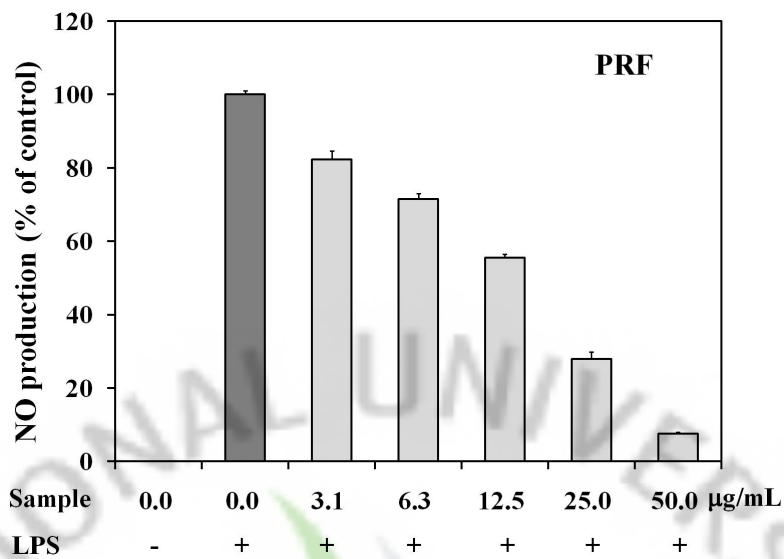
**Fig. 1-36. Cytotoxicity of PMF 7 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean±S.D. of determination values.

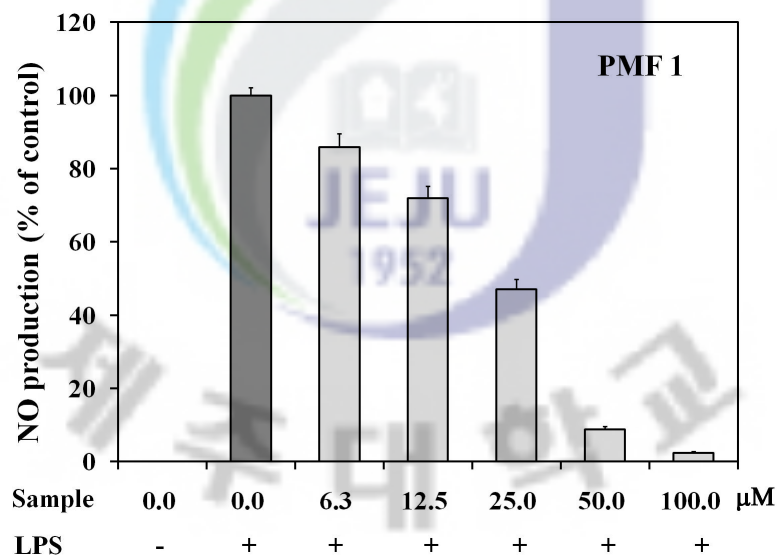


**Fig. 1-37. Cytotoxicity of PMF 8 on LPS-stimulated RAW 264.7 cells.**

Cells were incubated with the indicated concentration (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) of PMF 8 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Cytotoxicity was determined by MTT and LDH assay. The data represent the mean±S.D. of determination values.



**Fig 1-38. Effect of PRF on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL) of PRF for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean±S.D. of determination values.



**Fig 1-39. Effect of PMF 1 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM) of PMF 1 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean±S.D. of determination values.

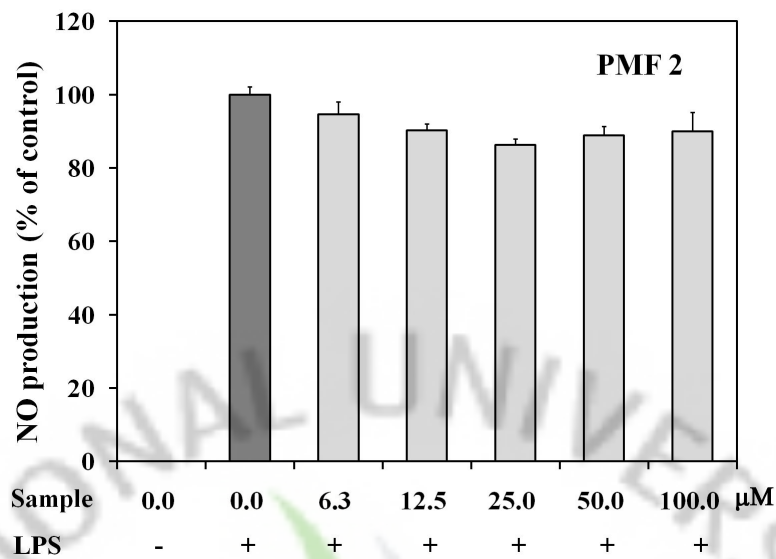


Fig 1-40. Effect of PMF 2 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 2 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

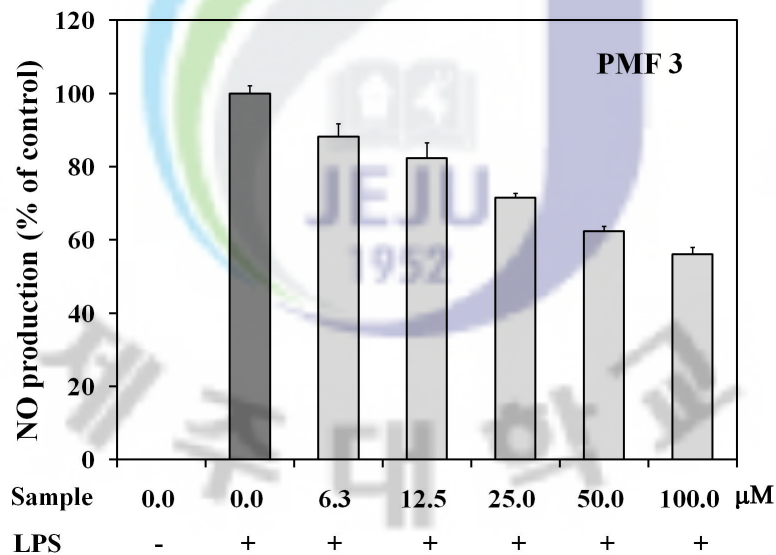
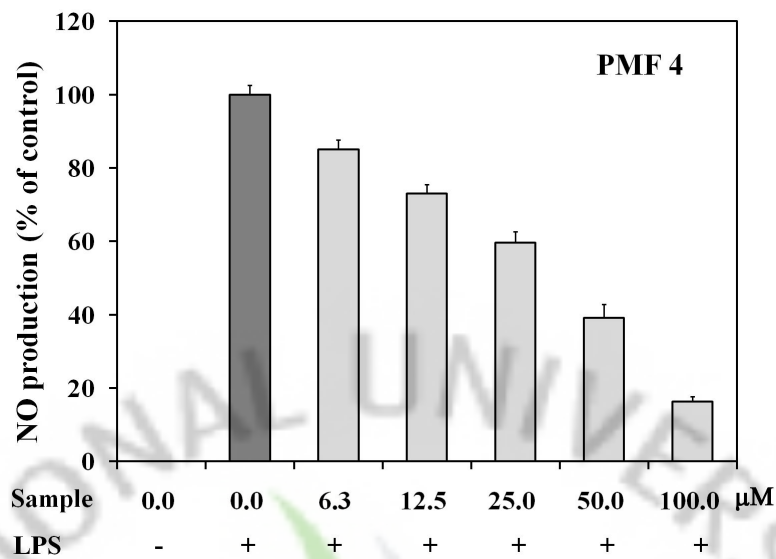
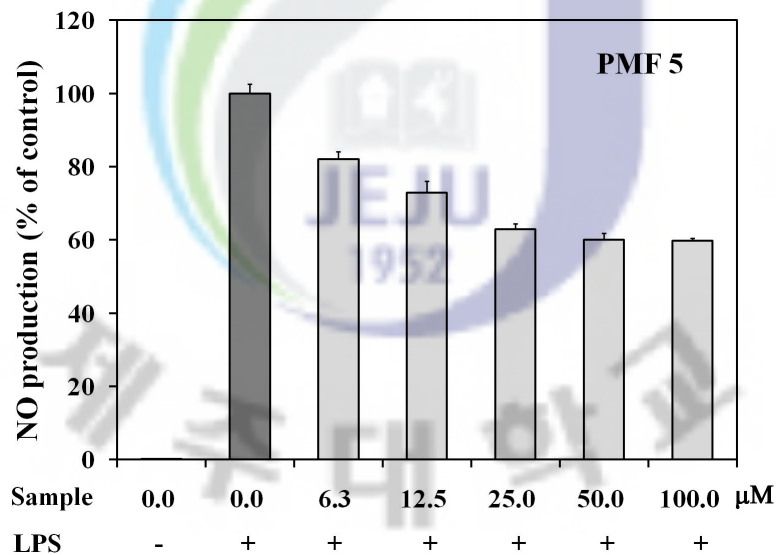


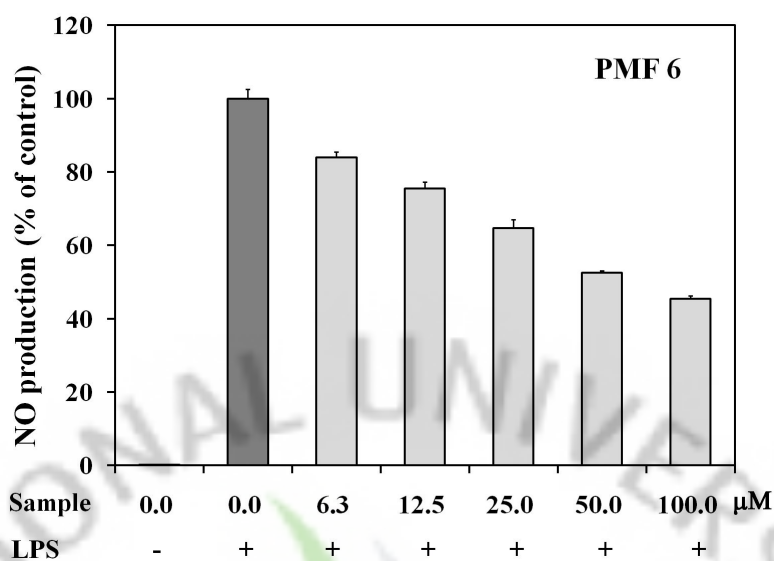
Fig 1-41. Effect of PMF 3 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 3 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



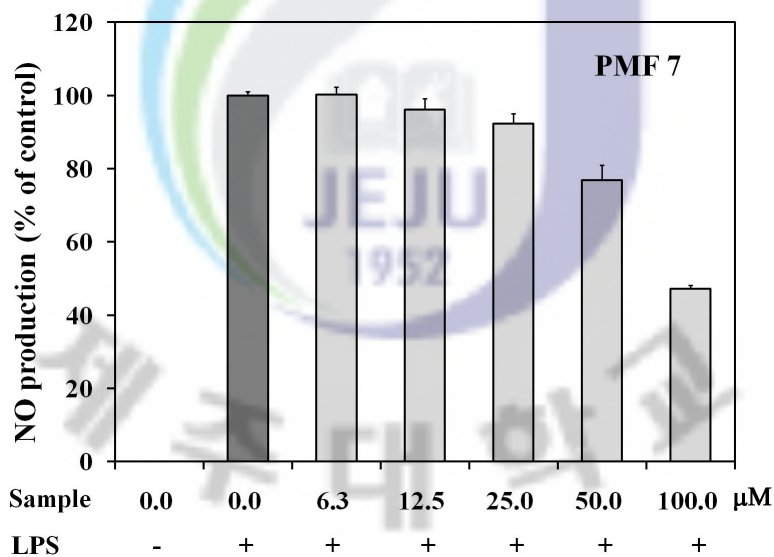
**Fig 1-42. Effect of PMF 4 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 4 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



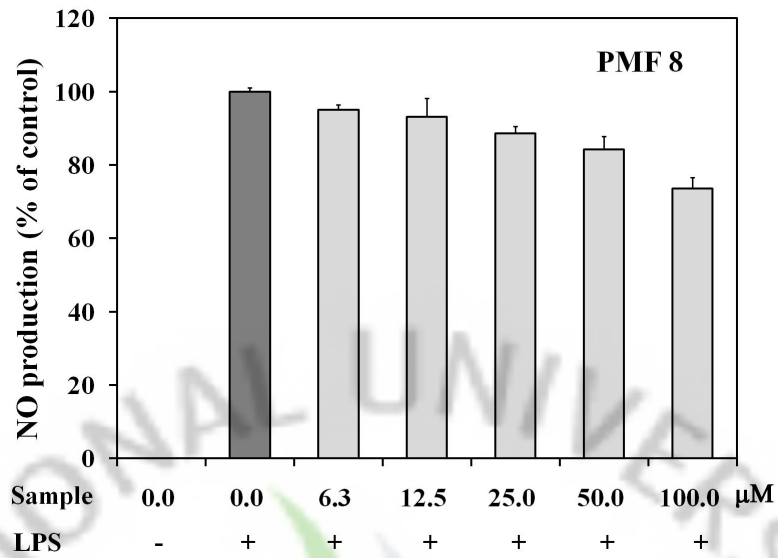
**Fig 1-43. Effect of PMF 5 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 5 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig 1-44. Effect of PMF 6 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 6 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig 1-45. Effect of PMF 7 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig 1-46. Effect of PMF 8 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 8 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

#### 4. 고 찰

우리나라에서 생산되는 감귤의 95% 이상이 온주밀감이고 제주재래감귤을 포함하는 만감류는 5% 정도에 불과하다(김세재, 2007). 이처럼 제주에서 자생하거나 재배되고 있는 재래감귤은 온주밀감에 비해 산업적·경제적인 측면에서 크게 뒤처지면서 오랫동안 등한시 되어 왔다. 중국에서는 'Zhi qiao'라고 불리는 성숙한 감귤(*Citrus aurantium* L)의 건조 과피를 전통적으로 중요한 약재로 사용해 왔으며 항암, 항고혈압, 항쇼크(anti-shock) 활성 등과 같은 다양한 생리활성이 있다고 알려져 있다(Satoh et al., 1996; Huang et al., 1995; Zhao et al., 1989). 제주에서도 재래감귤에 대한 항산화, 항염, 항암 등과 같은 생리활성 연구와 재래감귤의 주요 구성 성분에 대한 연구 등 다양한 효능과 유효성분들이 밝혀지면서 제주의 재래감귤은 산업적·경제적 활용가치에 대한 중요한 산업원료로 재평가 받고 있다(김용덕 등 2009; 김창민 등, 1979; 오진보 등, 1996; 현재석 등, 2010; Cui et al., 2007; Kang et al., 2000; Lee et al., 2005).

제주에서 자생하는 감귤류에는 진귤(산귤)을 비롯해 지각(*Citrus aurantium*), 감자(*Citrus benikoji*), 동정귤(*Citrus erythroasa*), 당유자(*Citrus grandis*), 청귤(*Citrus nippoloreana*), 병귤(*Citrus platymamma*), 사두감(*Citrus pseudogulgul*), 홍귤(*Citrus tachibana*), 편귤(*Citrus tangerina*), 유자(*Citrus junos*), 빈귤(*Citrus leiocarpa*) 등이 있다(김세재, 2007). 이 중에서 병귤, 빈귤, 진귤, 청귤, 홍귤 등이 다른 감귤 종에 비해 높은 PMFs 함량을 보이는 것으로 조사된 바 있다(Choi et al., 2007; Nogata et al., 2006). 항암 활성, 항증식 활성, 항균 활성, 항알레르기 활성 등과 같은 다양한 기능을 가지는 PMFs는 기능성 소재로서의 가치가 높기 때문에 PMFs를 분리하는 다양한 방법들이 개발되고 있다(Johann et al., 2007; Ko et al., 2010; Yoshimizu et al., 2004). 본 연구에서는 제주 재래감귤 중 높은 PMFs 함량을 보이는 진귤로부터 PMFs를 다량 함유하는 조성물(PRF)을 분리하고, 그로부터 항산화와 항염 활성을 확인함으로써 진귤에 대한 기능성 산업소재로서의 활용가능성을 평가하고자 하였다.

감귤로부터 PMFs를 얻기 위한 대부분의 추출방법은 alcohol, n-hexane,

CHCl<sub>3</sub>, acetone과 같은 유기용매를 사용한다(Hirata et al., 2009; Johann et al., 2007; Kawaii et al., 2000; Manthey and Grohmann, 2001). 이와 같이 비극성 성질을 갖는 유기용매를 추출용매로 사용하여 감귤 과피를 추출할 경우 과피에 함유되어 있는 다양한 비극성 화합물들이 동시에 추출될 수 있다. 따라서 감귤로부터 비교적 순수한 PRF와 PMFs를 분리하기 위해서는 추출, 농축, 분획, 크로마토그래피 등과 같은 많은 단계의 정제과정과 그에 따른 시간과 인력을 필요로 한다(Chen and Montanari, 1998; Li et al., 2005; Li et al., 2007; Li et al., 2008). Xu 등(2007)에 의하면 중국에서 진피로 사용되어온 ‘청피’라 불리는 감귤의 과피를 열수 추출한 결과 PMFs의 추출 효율이 비교적 우수한 것으로 확인하였다. 일반적으로 PMFs를 비롯한 대부분의 플라보노이드는 비극성 화합물로 알려져 있다(Siess et al., 2000). 이러한 이유로 PMFs와 같은 비극성 화합물들이 열수 추출법에 의한 추출 효율은 크게 떨어지는 것으로 알려져 있다. 하지만 PMFs는 구조적으로 플라보노이드 골격 주위에 많은 메톡시기(-OCH<sub>3</sub>)가 결합되어 있다(Dandan et al., 2007; Li et al., 2007; Malikov and Yuldashev, 2002). 이러한 ‘메톡시기’ 구조의 메틸기(-CH<sub>3</sub>)는 비극성 성질을 갖고 있지만, 산소원자(O)는 극성인 성질을 갖고 있다. 이러한 양쪽성 성질을 갖는 메톡시기의 화학적 구조는 고온(100℃)의 극성용매 조건에서 반응성이 커진 메톡시기의 작용으로 PMFs 화합물이 열수 추출 조건에서도 우수한 추출 효율을 보이는 것으로 사료된다. 하지만 실온상태에서의 PMFs는 다시 비극성 성질이 극성인 성질보다 강하게 작용할 것이고, 추출된 열수 추출액에 유기용매를 사용하여 용매분획을 수행하였을 경우 PMFs가 유기용매로 분리될 것이라는 가정하에 본 실험을 수행하였다. 이러한 가정으로부터 본 연구에서는 PMFs를 분리하기 위해 열수 추출과 다양한 분획용매(n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH)를 사용하여 분획을 실시하였고, 그로부터 얻어진 PRF로부터 감귤과피의 주요 PMFs인 sinenstin, nobiletin, tangeretin에 대한 조성비를 확인하였다.

각각의 분획물에서 sinenstin, nobiletin, tangeretin에 대한 함량을 HPLC를 사용하여 분석할 결과 n-hexane 분획물에서 75.8%의 높은 PMFs 함량을 함유하는 것으로 확인되었고, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 분획물은 각각 58.0, 6.5, 2.1%의 조성비를 나타내었다(Table 1-4). n-hexane 분획물과 CHCl<sub>3</sub>분획물에서 PMFs 포



준물질(sinensetin, nobiletin, tangeretin)외에 다른 6개의 플라보노이드는 검출되지 않았다. 하지만  $\text{CHCl}_3$  분획물에 대한 HPLC chromatogram의 Group 1과 Group 2에서 표준물질 외에 다른 피크가 관찰되는 것으로 보아, 표준물질 이외의 다른 화합물들이 함유되어 있는 것으로 사료된다. EtOAc 분획물과 n-BuOH 분획물에서는 PMFs 표준물질에 비해 비교적 많은 플라보노이드인 naringin과 hesperidin을 함유되어 있는 것으로 분석되었다. 또 각 분획물의 건조과피로부터 추출된 추출 효율을 확인한 결과 n-hexane,  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, n-BuOH 분획물은 각각 0.15, 0.31, 0.64, 0.77%의 추출 효율을 보였다(Table 1-4). n-hexane 분획물은 가장 높은 PMFs 조성비를 보였으나, 가장 적은 추출효율을 보였고,  $\text{CHCl}_3$ 은 비교적 높은 조성비와 n-hexane 분획물보다 높은 추출효율을 보였다.  $\text{CHCl}_3$ 은 사용하는 제품의 추출용매로 사용할 수 없으나, n-hexane은 식물로부터 식품을 제조하는 추출용매로 사용이 가능한 용매이다(Akoh, 2006). 따라서 n-hexane은 열수추출물로부터 가장 좋은 PMFs의 조성비를 얻기 위해 사용되는 유기용매 중 가장 적합한 유기용매로 판단하였고, n-hexane 분획물을 'PRF'로 명명하였다.

PRF 조성물을 HPLC로부터 분석한 크로마토그램에서 Group 3의 머무름 시간에서 나타나는 3개의 표준물질(sinensetin, nobiletin, tangeretin) 외에도 여러 개의 작은 피크들이 검출되었다(Fig. 1-6). 일반적으로 감귤과피에서는 분석한 3개의 PMFs 외에도 다양한 PMFs들이 존재한다고 알려져 있다(Iwase et al., 2001; Machida and Osawa, 1989). 또한 그들의 머무름 시간은 대부분 Group 3 부근에 분포한다(Choi et al., 2007; Green et al., 2007; Wang et al., 2008). 그러므로 PRF 조성물 내 Group 3의 머무름 시간에 나타나는 피크로부터 또 다른 PMFs들이 존재한다는 것을 예측할 수 있다. 따라서 PRF 조성물로부터 다양한 PMFs에 대한 분리를 진행하였다. 먼저 진귤 건조과피 1.5 kg을 열수 추출한 후 용매분획하여 2.5 g의 PRF를 얻었고, 이에 대한 추출효율은 0.17%를 나타내었다. 얻어진 PRF 조성물을 semi-prep LC를 사용하여 HPLC 크로마토그램의 Group 3 부분의 피크들을 분취한 결과 분석된 sinensetin, nobiletin, tangeretin 외에도 3개의 PMFs와 한 개의 히드록시기가 치환된 구조의 PMFs 2 종을 분리하였다. PMF 1, PMF 2, PMF 3, PMF 4, PMF 5, PMF 6, PMF 7, PMF 8은  $^1\text{H-NMR}$ 와  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 각 PMFs의 메톡시기 개수와 산소가 치환된 이중결합의 개수가 일

치하였고, 한개의 카르보닐기가 공통적으로 관찰되었다. 각각의 PMFs를 분석한 결과 PMF 1은 5,7,4'-trimethoxyflavone, PMF 2는 tetra-O-methylisotellarein, PMF 3은 sinensetin, PMF 4은 nobiletin, PMF 5은 tangeretin, PMF 6은 isosinensetin, PMF 7은 5-demethylnobiletin, PMF 8은 5-demethyltangeretin으로 동정되었다(Dandan et al., 2007; Li et al., 2006; Machida and Osawa, 1989).

PRF에서 분취된 8개의 PMFs 중 분석한 3 종의 표준물질은 64.3%의 분취효율을 나타내었다. 또한 분취된 5개의 PMFs의 분취는 7.3%를 나타내었다. 그리고 HPLC를 이용하여 sinensetin, nobiletin, tangeretin의 함량을 분석해 본 결과, 75.8%의 함량이 64.3% 수준의 분취율을 보였고, 분취된 나머지 5개 PMFs는 7.3% 이상의 함량을 나타낼 것으로 추정된다. 이처럼 PRF에 함유된 다양한 PMFs의 함량을 모두 합하면, PRF의 실제적인 PMFs 함량은 75.8%보다 더 높은 85% 수준의 PMFs를 함유하는 조성물일 것으로 판단된다. 이러한 간단한 분석으로부터 얻어진 PRF 조성물은 일반적으로 PMFs를 얻기 위해 사용되는 유기용매 추출을 이용한 추출방법보다 매우 빠르고 간단한 방법이다(Chen and Montanari, 1998; Raman et al., 2005). 이와 같은 이유로 PMFs 추출법은 유기용매보다 열수 추출을 이용하는 것이 보다 효율적이고, 산업적으로도 유용할 것으로 판단된다.

분리된 PRF와 8개의 PMFs에 대한 항산화 효과를 관찰한 결과, DPPH 라디칼 소거 활성은 나타나지 않았다. 일반적으로 플라보노이드는 항산화 효과가 뛰어나다고 알려져 있다. Yu 등(2005)에 의하면 감귤에 함유되어 있는 Rutin (32.18%), Scutellarein (18.32%), Neoeriocitrin (17.18%), Kaempferol (12.79%)이 10 $\mu$ M 농도에서 DPPH 라디칼 소거 활성을 갖는다고 보고하였고, hesperidin은 100  $\mu$ M 농도에서 37% 수준의 소거 능력을 보인다고 보고하였다(Wilmsen, et al., 2005). 하지만 DPPH 라디칼 소거 활성이 확인되는 플라보노이드의 구조는 PMF 1 ~ PMF 8의 기본구조(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)와 동일하나, 메톡시기가 아닌 히드록시(-OH)기와 배당체가 결합되어 있는 플라보노이드 구조를 갖고 있다. 이러한 구조적 차이로 인하여 DPPH 라디칼 소거능력이 PMFs에서는 관찰되지 않은 것으로 사료된다.

LPS를 처리하여 NO를 생성시킨 RAW 264.7 대식세포에서 PRF와 분리된 PMFs에 대한 NO 생성 저해율을 관찰하였다. PRF 조성물은 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰고, 50  $\mu$ g/mL의 농도에서는 7.5% 수준의 NO만 측정되었

다. 또한 PMF 1 ~ PMF 8의 NO 생성 저해능을 확인한 결과 PMF 2를 제외한 모든 PMFs에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시키는 것으로 확인되었다. Choi 등(2007)이 보고한 내용에 따르면, 감귤 과피에 함유되어 있는 다양한 flavonoid 중 PMFs(nobiletin, tangeretin)는 항염 활성과 밀접한 관련이 있다고 보고하였고, 비교한 플라보노이드 중 nobiletin이 가장 우수한 NO 생성 저해 활성을 보인다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 nobiletin(PMF 4)를 처리한 RAW 264.7 세포에서 우수한 NO 생성 저해율(16.3%)을 보였다.

따라서 본 연구결과에서는 메톡시기의 수에 따른 NO 생성 저해율을 각 분리된 PMFs에 대하여 비교해 보았다. 실험 결과 PMF 2는 4개의 메톡시기를 갖는 PMFs로 생성된 NO의 감소는 나타나지 않았다. 하지만 4개의 메톡시기를 갖고 있는 PMF 8에서는 73.6%의 NO가 측정되어 다른 PMFs에 비해 낮은 NO 생성 저해율을 보였다. PMF 3, PMF 5, PMF 7은 5개의 메톡시기를 갖는 PMFs로 45.4 ~ 59.8% 수준의 NO가 측정되었고, PMF 4는 6개의 메톡시기를 갖는 PMFs로 16.3% 수준의 NO가 측정되었다. 이러한 결과로부터 메톡시기가 많은 PMFs일수록 NO 생성을 감소시키고 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 분리된 8개의 PMFs 중에서 PMF 1이 가장 뛰어난 NO 생성 저해율(2.4%)을 나타내었다. PMFs은 PMF 1과 PMF 2를 제외하고는 결합된 메톡시기의 수에 따라 NO 생성을 감소시키는 경향을 보였다. 그리고 PMFs의 각기 다른 탄소 위치에 결합된 메톡시기와 NO 생성 저해 활성과의 관계를 살펴보았으나 뚜렷한 상관성은 관찰되지 않았다. 또한 PMFs 구조와 독성과의 관계를 살펴보면 대부분의 결과에서 세포독성은 메톡시기의 수나 결합위치와 상관없이 분리된 모든 PMFs에서 나타나지 않았다. 하지만 이러한 경향은 보다 많은 PMFs를 대상으로 하여 그들의 구조와 메톡시기와와의 관계를 비교해 봄으로써 PMFs의 구조와 NO 생성 저해 활성, 그리고 세포독성과의 관계를 확인해 볼 필요가 있다고 사료된다. 이러한 화학적 구조와 활성과의 관계로부터 보다 유용한 화학적 구조를 유추해 낼 수 있기 때문이다(Bergmann and Yagen, 1989; Cao et al., 1997; Rice-Evans et al., 1996).

RAW 264.7 세포에서 iNOS는 조직 내에 장시간 동안 많은 양의 NO를 생성하게 되어 염증과 종양을 유발하며(Nathan, 1992), 유전자의 변이 및 신경 등의 손상을 초래한다. 이러한 작용기전들은 다양한 인자로부터 발현된다(Stuehr et

al., 1991). 하지만 본 연구에서 PRF 조성물과 8개의 PMFs로부터 보다 명확한 NO생성 저해 메커니즘을 확인하는 실험은 수행하지 못했다. 이러한 작용기전 연구는 sinensetin, nobiletin, tangeretin 등에 한하여 일부 진행되었지만, 다른 PMFs에 대한 작용기전 연구는 현재 전무한 상태로 앞으로 이에 대한 더 심층적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 PRF 조성물의 다양한 활성 평가와 표준화 연구를 통하여 산업적으로 이용할 수 있는 기틀을 마련하고 공정을 확립하게 된다면, PRF 조성물이 기능성식품, 기능성화장품, 그리고 의약품 등과 같은 고부가가치 기능성 원료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.



## Part II-2. 제주 조릿대 유효성분 분리 및 생리활성

### 1. 이론적 고찰

조릿대류는 벼과(Gramineae), 대나무아과(Bambusoideae)의 조릿대속(*Sasa*)에 속하는 식물군으로 한국, 중국, 일본을 비롯한 아시아 국가에 널리 분포하고 있다(Nakajima et al., 2003; Park et al., 2007). 조릿대는 번식능력이 왕성하며 군락을 형성하고, 개화는 60년 주기로 아주 드물게 일어나며, 개화와 결실을 하고 난 후 수명을 다하는 것으로 알려져 있다.(Numata, 1970; Campbell, 1985; Makita, 1992, Kitamura and Kawahara, 2009). 조릿대류 중에서 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 제주도 한라산 일대에서만 제한적으로 분포하는 지역 고유종으로 분포지 내에서 대규모의 군락을 이루어 생육하고 있다. 그리고 내륙에 자생하는 조릿대(*S. borealis* (Hack.) Makino)와 비슷하지만 대부분 가지가 갈라지지 않으며 키가 작고 절(node)의 형태가 달라 한라산 특산식물로 알려져 있다(김창호, 1996; 김현철 등, 2007).

조릿대의 성분 연구는 주로 일반 성분조성을 중심으로 이루어져 왔다. 조릿대 잎은 줄기보다 수분(28.79%, 59.87%), 단백질(6.33%, 2.42%), 조지방(3.43%, 1.21%), 회분(3.76%, 0.99%) 등 일반 성분의 함량이 높으며, acetic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid, tartaric acid, formic acid, malic acid, fumaric acid 등의 유기산 함량도 높다(고명수, 2008). 또한 조릿대 잎은 칼륨(21.3 mg/g), 칼슘(11.4 mg/g), 마그네슘(2.85 mg/g), 나트륨(1.43 mg/g) 등의 무기성분과 총 아미노산(93.3 mg/g), 불포화지방산인 linoleic acid를 다량 함유하는 것으로 알려져 있다(정창호 등, 2008). Tanaka 등(1988)은 조릿대에서 triterpene 계열 화합물인 friedelin, glutinol 등과 플라보노이드 계열 화합물인 isoorientin을 분리하였으며, 조릿대와 유사한 화합물이 존재한다고 알려진 대나무류에서 nomoorientin, orientin, vitexin, isovitexin, naringin-7-rhamnoglucoside, luteolin, triclin 등과 같은 플라보노이드 성분이 확인되었다(Lu et al., 2005).

최근 들어 조릿대에 대한 다양한 생리활성 연구와 더불어 새로운 화합물을 분리하고 그에 대한 생리활성을 확인하기 위한 많은 연구들이 수행되고 있다. Nakajima 등(2003)은 tricin의 형태를 갖는 6개의 새로운 flaonolignans을 *Sasa veitchii*로부터 분리하였다고 보고하였다. Hasegawa 등(2008)은 *S. kurilensis*로부터 kureilensin A와 kureliensin B의 신규 flavone glycoside 2종, 2개의 tricin 유도체, 2개의 tetrabenzoate를 분리하였다. 그리고 Sakai 등(2008)은 *S. albo-marginata*에서 분리한 5개의 폴리페놀 화합물이 인간 항거대세포바이러스(anti-human cytomegalovirus) 활성을 갖으며, 그 중 tricin이 가장 좋은 활성을 보인다고 보고하였다. Jeong 등(2005)은 *S. borealis*로부터 (+)-5,5'-dimethoxylariciresinol와 (3S,5R,6S,7E)-5,6-epoxy-3-hydroxy-7megasig-men-9-one을 분리하였고, 또한 *S. borealis*로부터 분리한 (-)-syrin-garesinol와 tricin은 약물 저항성을 갖게 하는 주요 요인인 p-glycoprotein의 억제제로 작용한다고 보고하였다(Jeong et al., 2007). 그리고 Lim 등(2007)은 조릿대에서 분리한 isoorientin이 산화적 스트레스가 발생할 경우 phosphatidylinositol 3-kinase signaling을 통하여 ARE(antioxidant response element)에 결합하여 항산화물질(산화효소와 해독효소)의 생성을 증가시키는 전사인자인 Nrf2를 유발하는 효과를 보인다고 보고하였다. Park 등(2007)은 이로부터 분리한 tricin과 3개의 flavone glycoside에 대한 항산화 활성 연구를 수행하여 BHT와 BHA보다 우수한 활성을 갖는다고 보고하였다. Choi 등(2008)은 *S. borealis*의 추출물로부터 산화적 스트레스로 유발된 고농도의 포도당으로부터 혈관내피의 기능장애를 보호하는 anti-apoptotic 활성을 갖는다고 보고하였고, Yang 등(2010)은 고지방식이로 비만을 유도한 C57/BL6J 마우스에서 인슐린 저항 개선 효과를 보고하였다. 윤기동 등(2000)은 *S. borealis*로부터 tricin, tricin 7-O-β-D-glucopyranoside, luteolin 6-C-α-L-arabinopyranoside를 분리하였고, Lee 등(2007)과 Jeong 등(2007)은 2개의 테르펜 화합물(friedeline, 3-hydroxyglutinol), 1개의 오일 성분(squalene), p-hydroxybenzaldehyde를 분리하였다.

제주조릿대(*S. quelpaertensis*)의 성분 에 대한 연구는 최근 들어 관심이 증가하고 있다. An 등(2008)은 제주조릿대에서 분리한 p-coumaric acid가 멜라닌 세포 자극 호르몬(melanocyte-stimulation hormone, MSH)으로부터 유발된 멜라닌을 억제하는 미백효과를 갖는다고 보고하였고, Lee 등(2008)은 마우스의 간독성을

예방한다고 보고하였다. Sultana와 Lee 등(2009, 2010)은 제주조릿대에서 3-O-p-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanone, 3-O-p-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-O-β-glucopyranosylpropanol, (E)-3-hexenyl-β-glucopyranoside의 3개 신규 화합물과 N-p-coumaroyl serotonin, N-feruloyl serotonin, p-coumaric acid, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy 3,5-dimethoxyphenyl)-1-propanone, saikochromone, isoorientin, daucosterol, lutein, triclin-3',4',5'-tri-O-methyl-7-O-β-glucopyranoside 등을 분리하여 보고하였다.

예로부터 조릿대는 고혈압, 발한, 증풍 등을 위한 민간요법으로 활용이 되어 왔으며, 항궤양 활성, 항염 활성, 진정작용, 해독작용, 이뇨작용, 혈압강화작용, 항암 활성, 항균 활성을 갖고 있어(Nakajima et al., 2003; Lu et al., 2005; Kurosumi et al., 2007; Hasegawa et al., 2008; Sakai et al., 2008) 산업적 활용도가 높다고 평가되고 있다. 본 연구는 제주도 한라산에서 서식하고 있는 제주 조릿대의 구성성분을 분리하여 동정하고, 분리된 화합물의 항산화 활성과 항염 활성을 평가함으로써 제주조릿대가 기능성 식의약품 소재로 활용이 가능한지를 확인하기 위한 목적으로 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료 및 사용기기

#### 1) 재료

본 실험에 사용된 조릿대 잎은 2008년 7월 ~ 9월 사이 제주도 교래리 물찾오름 지역에서 1년생 잎만을 채집하였다(Fig. 2-1). 채집된 조릿대 잎은 흐르는 물로 수세한 후 열풍건조기로 건조시켜 분쇄하였고, 이를 -20℃ 냉동고에 보관하여 시료로 사용하였다.



Fig. 2-1 Photograph of *Sasa quelpaertensis* Nakai.

#### 2) 시약

조릿대 잎의 추출, 용매분획 및 분리를 위해 사용된 용매들은 Fisher Scientific Korea (Seoul, Korea)사의 HPLC 등급 용매를 사용하였다. 순상 컬럼 크로마토그래피 충전제로는 Silica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck사)을 사용하였다. 그리고



Semi-prep LC를 위한 전처리 수지는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 mesh, Merck사)을 사용하였다. 또 NMR 분석용 용매는 Merck사의 CD<sub>3</sub>OD와 DMSO-d<sub>6</sub>를 사용하였다.

### 3) Semi-prep LC

분획 성분은 Semi-prep LC (Waters사, 2695 Alliance system, USA)를 사용하여 분취하였다. 이 때 Semi-prep LC는 2개의 펌프, 컬럼 오븐, 자동시료주입기, 분획 수집기, PDA 검출기로 구성되어 있으며, 시료 루프의 용량은 100 µL이다.

### 4) NMR Spectrometer

구조분석에 이용된 NMR 분광기는 400 MHz FT-NMR (JEOL사, JNM-LA, Japan)을 이용하였고, 용매는 Merck사의 CD<sub>3</sub>OD와 DMSO-d<sub>6</sub>를 사용하였다.

## 2-2. 활성물질의 분리

### 1) 추출 및 용매분획

80% 에탄올 40 L에 분쇄된 조릿대 잎 2.0 kg을 넣고 상온에서 24시간 동안 2회에 걸쳐 반복 추출하였다. 에탄올 추출액은 감압여과장치를 이용하여 여과한 후 회전농축기(Buchi, R-200, Switzerland)를 사용하여 40°C에서 농축시켰다. 농축한 에탄올 추출물을 증류수 1L에 현탁시키고, 여기에 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 1 L씩을 가하여 각각 3회씩 순차적으로 반복하여 추출한 후 회전농축기를 사용하여 40°C에서 농축하였다(Fig. 2-2).

### 2) 구성성분의 탐색

각 분획물을 MeOH 용매에 50 mg/mL 농도로 녹인 후 테프론 필터로 여과하여 Semi-prep LC에 주입하였다. 분획물 성분은 먼저 210~600 nm 파장범위에서 PDA 검출기를 사용하여 성분의 흡광도를 검색한 후, 최종적으로 280 nm 파장에서 크로마토그램을 얻어내어 성분을 확인하였다(Table 2-1).

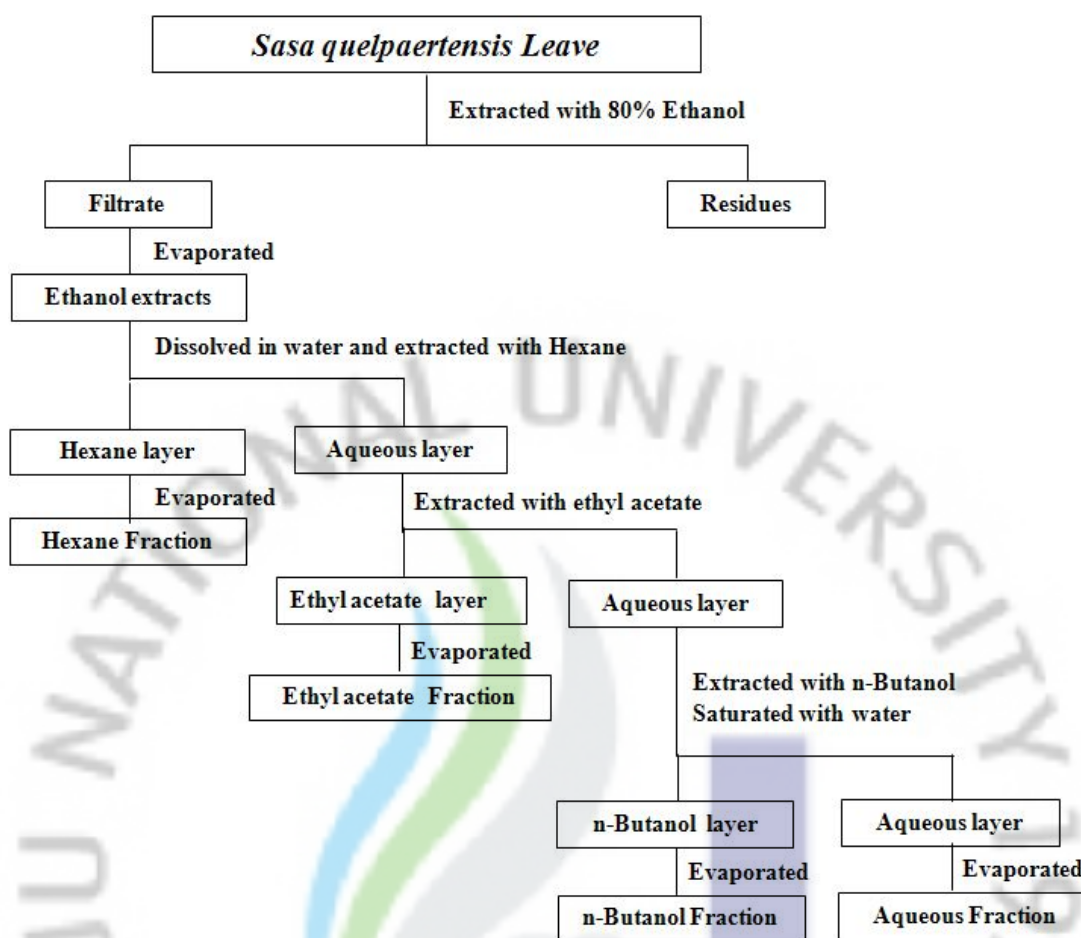


Fig. 2-2. Schematic diagram for fractionation of *S. quepaertensis*.

Table 2-1. Gradient elution condition for Prep-LC separation.

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.6	80	20
55.0	1.6	0	100
65.0	1.6	0	100
67.0	1.6	80	20
75.0	1.6	80	20

### 3) CHCl<sub>3</sub>과 EtOAc 분획물 성분 분리

CHCl<sub>3</sub>과 EtOAc 분획물은 순상 실리카겔 크로마토그래피법으로 n-hexane, EtOAc, MeOH 용매를 사용하여 분리하였다. CHCl<sub>3</sub> 분획물 19.28 g을 메탄올 소량에 녹여 열린 크로마토그래피 컬럼에 넣은 후 이들 용매를 사용하여 분리하였다. 용리액은 n-hexane:EtOAc(8:2, v/v) 혼합용매 300 mL를 가하여 용리시켰고, 점차적으로 EtOAc 비율을 100%까지 증가시킨 후 최종적으로 EtOAc:MeOH (1:1, v/v)이 되도록 조절하였다. 이러한 실험과정을 통해 각 6개의 fraction을 얻었고, 이를 100 mg/mL 농도가 되도록 묽힌 후 테프론 필터로 여과하였다. 여과된 분액을 Semi-prep LC에 주입하고 210 ~ 600 nm 범위에서 성분을 검출하였다. 이때 사용된 Semi-prep LC의 분리조건은 Table 2-2와 같이 설정하였고, 분취 컬럼은 40℃를 유지시켜 분획물 성분을 분취하였다. 또한 EtOAc 분획물은 4.67 g의 시료를 사용하여 CHCl<sub>3</sub> 분획물과 동일한 방법으로 성분을 분리하였다.

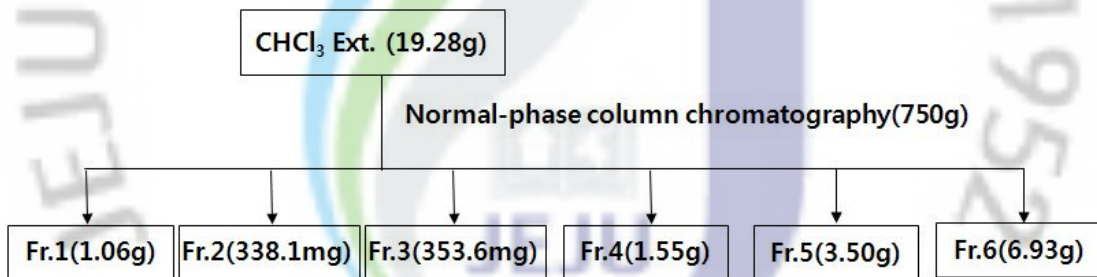


Fig. 2-3. Schematic diagram for isolation of CHCl<sub>3</sub> fraction.

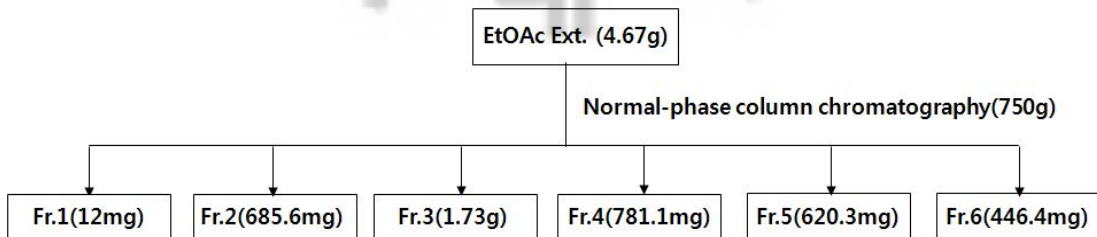


Fig. 2-4. Schematic diagram for isolation of EtOAc fraction.

#### 4) n-BuOH 분획물 성분 분리

Fig. 2-3과 같이 주사기 바늘에 탈지면을 넣고 실리카겔을 채워 역상 크로마토그래피 시스템을 구성한 후 MeOH 100 mL로 활성화시켰다. 여기에 100 mg/mL 농도가 되도록 묽힌 n-BuOH 분획물을 넣어 용리시켰다. 용출액은 다시 테프론 필터로 여과한 후 이를 Semi-prep LC 분취용 시료로 이용하였다. n-BuOH 분획물 분리를 위한 이동상 조건은 Table 2-3와 같고, 이때 PDA 검출기는 앞의 실험과 동일하게 210 ~ 600 nm 파장범위에서 머무름 시간이 일치하는 성분을 분취하였다.

**Table 2-2. Gradient elution condition of CHCl<sub>3</sub> and EtOAc fractions for prep-LC separation.**

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.6	80	20
60	1.6	0	100
70	1.6	0	100
72	1.6	80	20
80	1.6	80	20

**Table 2-3. Gradient elution condition of n-BuOH fraction for prep-LC separation.**

Time (min)	Flow (mL/min)	Water (%)	MeOH (%)
0	1.6	80	20
40	1.6	26.7	73.3
41	1.6	80	20
48	1.6	80	20

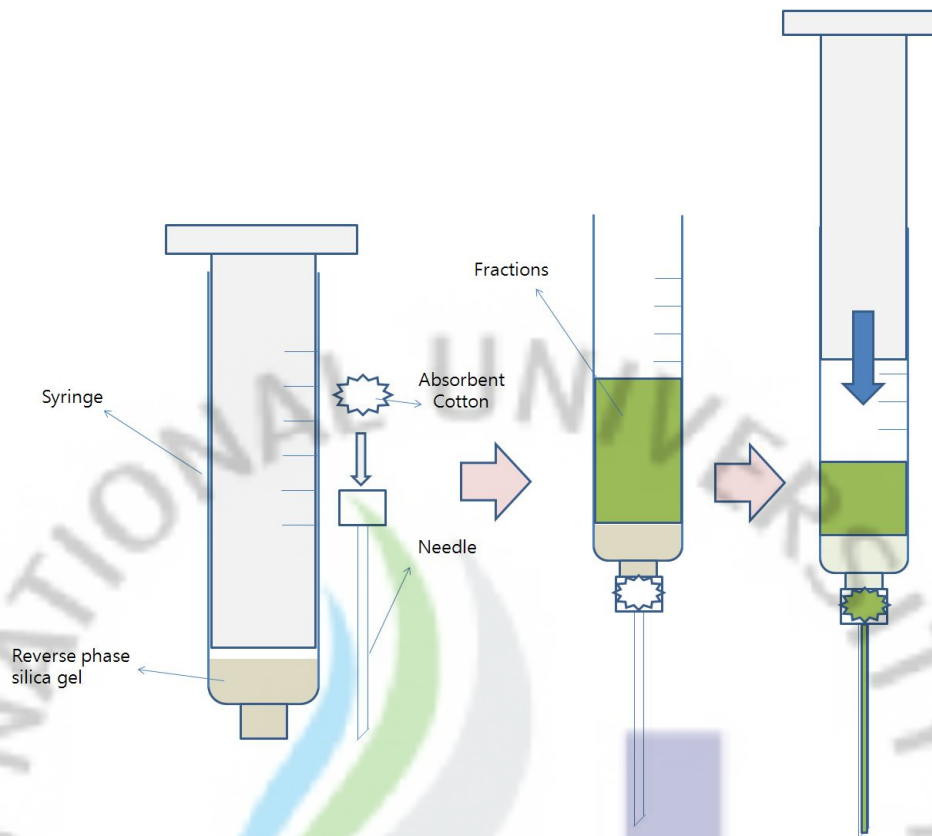


Fig 2-5. Syringe column system for the preparation of n-BuOH fraction.

### 2-3. 생리활성 평가

#### 1) DPPH 자유 유리기 소거 활성

시료의 전자공여능 측정은 Blois 방법 (Blois, 1958)에 따라 DPPH(Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 앞에서 분리한 시료를 여러 농도로 메탄올에 희석시킨 용액 100  $\mu$ L를 96 well plate에 분주하고, 여기에 0.4 mM DPPH 용액을 첨가하였다. 그리고 96 well plate를 차광상태에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 흡광도는 시료의 흡광도를 기준으로 표준화하였고, 대조군으로는 ascorbic acid와 BHA (Sigma, USA)를 사용하였으며 소거능은 다음의 식으로 산출하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 기준으로  $IC_{50}$ 으로 표시하였고, 각 시료에 대해 3회 반복한 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성 (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

$A_{\text{control}}$  = 메탄올 첨가 반응액 흡광도

$A_{\text{sample}}$  = 시료 첨가 반응액 흡광도

## 2) 대식세포의 배양

대식세포(Mouse RAW 264.7)는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았고, 이를 배양실험용 시료로 이용하였다. 대식세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C에서, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 배양하였다.

## 3) MTT assay

시료가 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT 분석법으로 미토콘드리아의 환원력을 측정하였다(Ferrari et al., 1990). DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에 RAW 264.7 세포를  $3 \times 10^4$  cells/well로 넣고 24시간 배양 후 여러 농도의 시료를 가하여 한 시간 배양하고, 여기에 LPS (Sigma, USA)를 100 ng/mL이 되도록 첨가한 후 22시간 동안 배양하였다. 다시 3-(4,5-dimethylthazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA)를 0.4 mg/mL이 되도록 넣고 한 시간 더 배양 후 배지를 제거하였다. 또 DMSO 200  $\mu$ L를 가하여 formazan 침전물을 용해시키고 microplate reader (Bio-tek, USA)로 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리한 군의 세포독성은 시료를 처리하지 않은 군과 흡광도 값을 비교하여 평가하였으며 세포독성은 다음의 식에 의해 산출하였다. 시료는 3회 반복 실험하였으며 아래 식에 의해 산출된 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = 추출물 미처리군

$A_{\text{sample}}$  = 추출물 처리군

#### 4) NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에서 생성된 NO의 양은 Griess법을 이용하여  $\text{NO}_2^-$  형태로 측정하였다. Griess 분석은 세포배양액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 이때 Griess 시약은 1% (W/v) sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride/2.5% (v/v) phosphoric acid 용액을 혼합하여 조제하였다. 그리고  $\text{NO}_2^-$  정량분석은 아질산나트륨 표준용액을 사용하여 표준검정곡선을 작성한 후 이를 이용하여 생성된 NO 값을 산출하였다.

### 3. 결 과

#### 3-1. 추출 및 분획

건조 제주조릿대 잎 2.0 kg을 80% 에탄올로 추출하고 농축한 후(165.7 g), 증류수 1 L에 현탁하여 용매분획을 실시하였고, 추출용매는 n-Hexane,  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, n-BuOH을 사용하였다. 이 용매를 순차적으로 각각 3회씩 가하여 분획한 추출물은 농축과정을 거쳐 최종적으로  $\text{CHCl}_3$ 에서 19.28 g, EtOAc에서 4.7 g, n-BuOH에서 25.7 g의 분획물을 얻어내었다. 얻어진 각 분획층은 PDA 검출기가 부착된 Prep-LC를 이용하여 파장범위 200 ~ 600 nm에서 각 성분들을 탐색하였다(Fig. 2-6~11). 그러나 이 중 헥산 분획물은 이 파장범위에서 적절히 검출되는 성분을 포함하고 있지 않아서 분리 대상에서 제외하였다. 먼저  $\text{CHCl}_3$ 의 경우를 보면, Prep-LC 크로마토그램에서 22 ~ 32분, 45 ~ 53분 사이의 머무름을 갖는 성분들은 각각 230, 300 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내었다. EtOAc에서는 16 ~ 30분 사이의 300 ~ 320 nm의 흡광도를 갖는 성분들이 분리능이 떨어져 피크들이 중첩되어 있는 것으로 보이며, 이 중 26분 정도의 머무름을 갖는 화합물이 가장 많은 양이 존재하는 것으로 관찰되었다. n-BuOH 분획물에서는 18분에서 25분 사이에 대부분의 성분들이 나타났으며, 이들 성분들은 흡수파장 240 ~ 340 nm 근처에서 높은 흡광도를 보이는 것으로 확인되었다. n-BuOH 분획물도 EtOAc 분획물과 유사하게 26분 정도의 비슷한 머무름을 나타내는 것으로 보아 이들 두 성분은 동일한 종류의 화합물로 추정되었다.



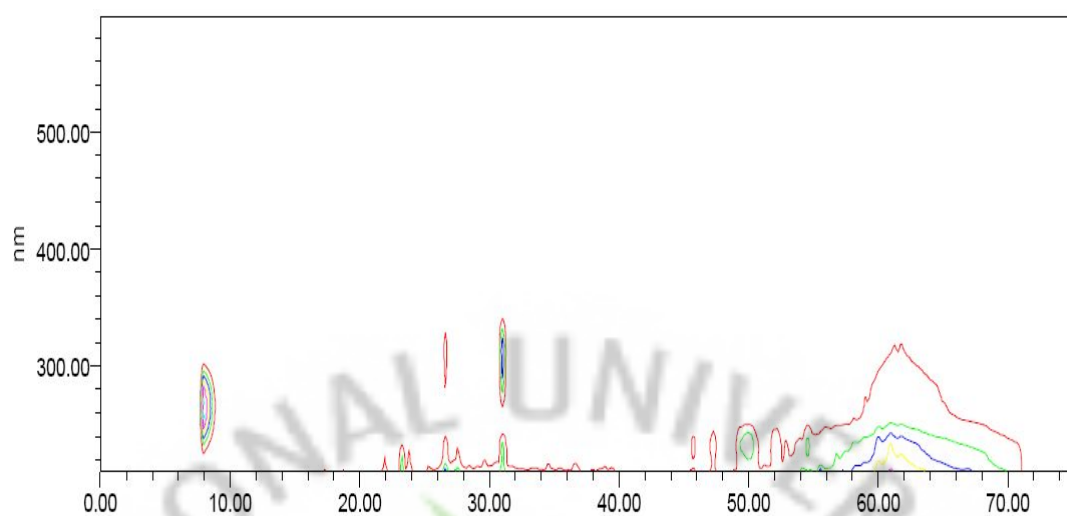


Fig. 2-6. 2D-contour plot of  $\text{CHCl}_3$  fraction obtained by PDA detector system.

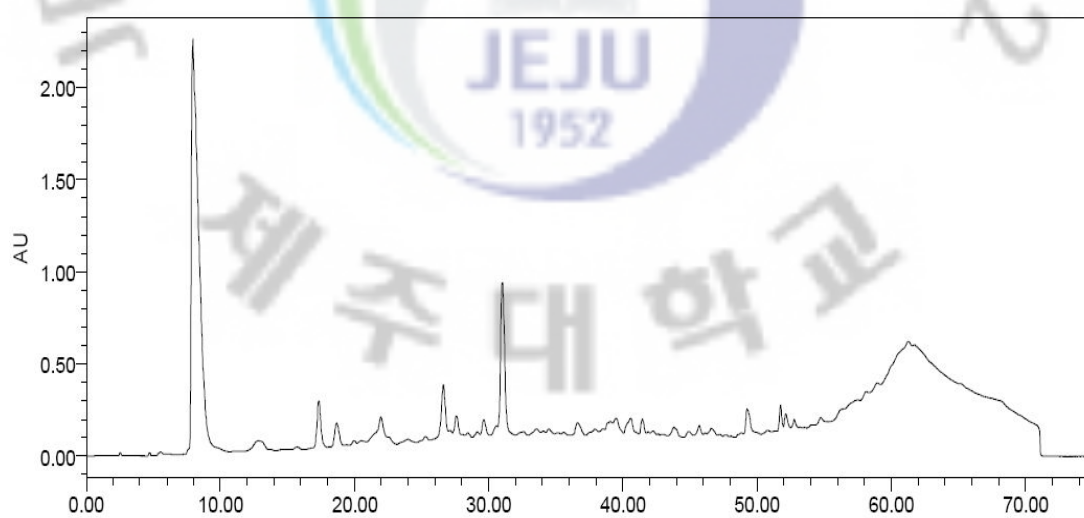


Fig. 2-7. HPLC chromatogram of  $\text{CHCl}_3$  fraction (at 280 nm detection wavelength).

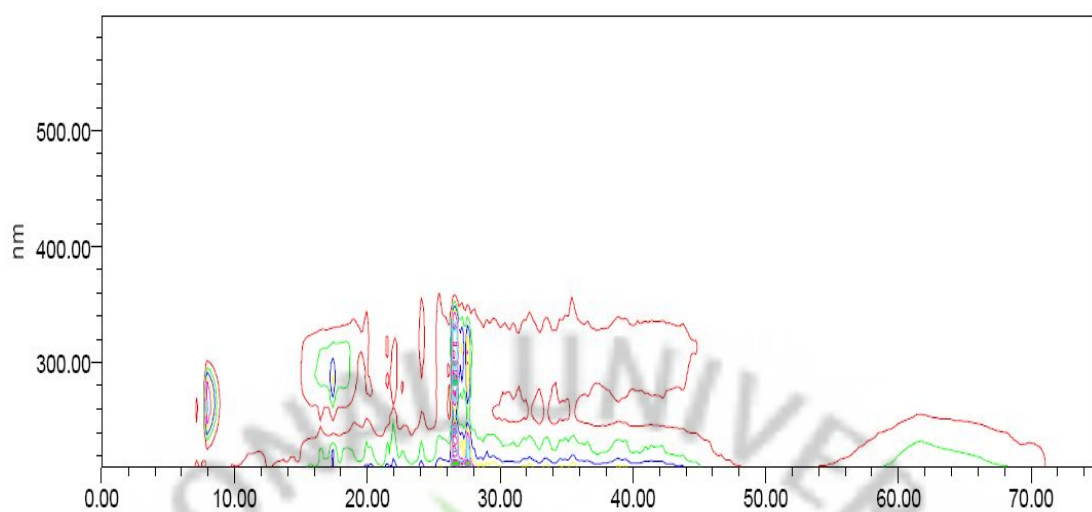


Fig. 2-8. 2D-contour plot of EtOAc fraction obtained by PDA detector system.

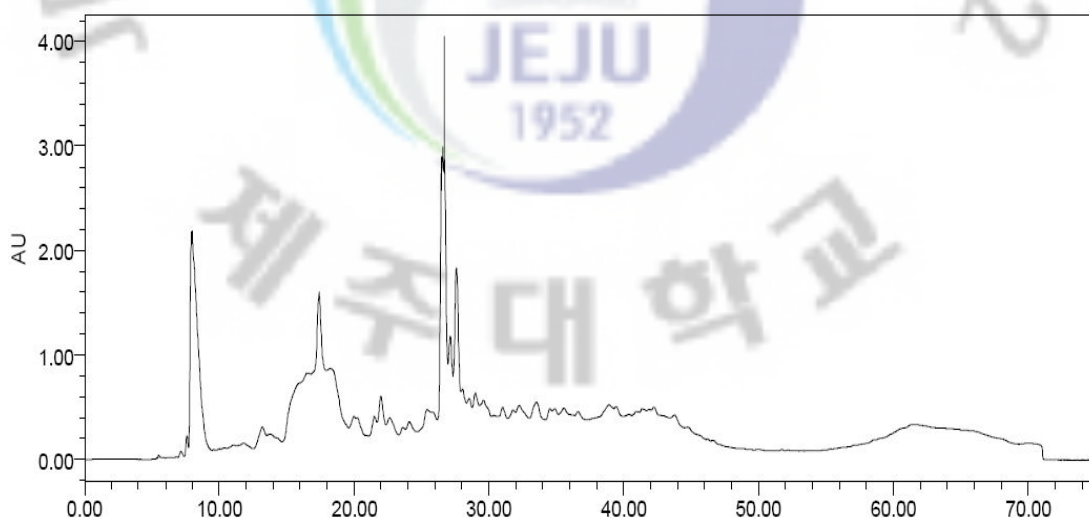
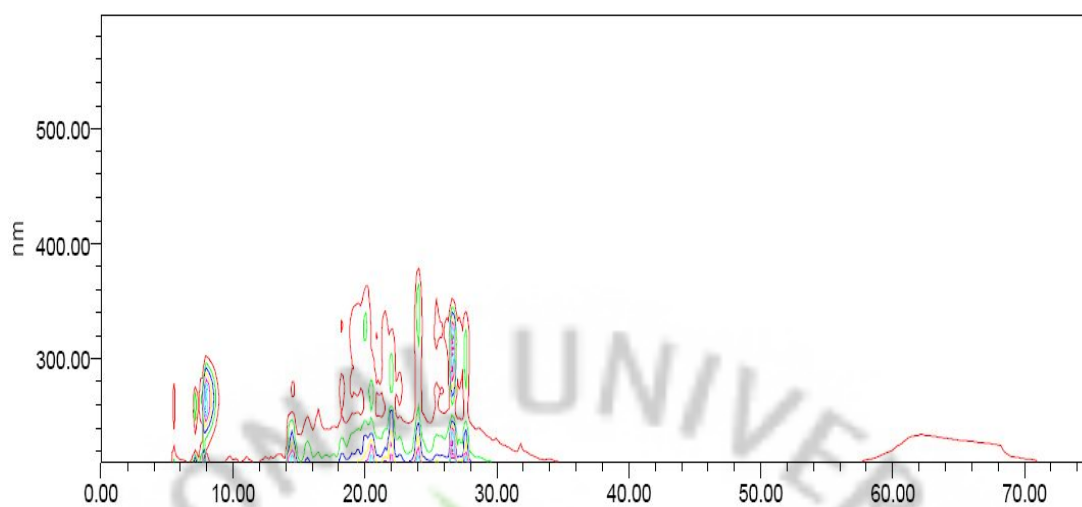
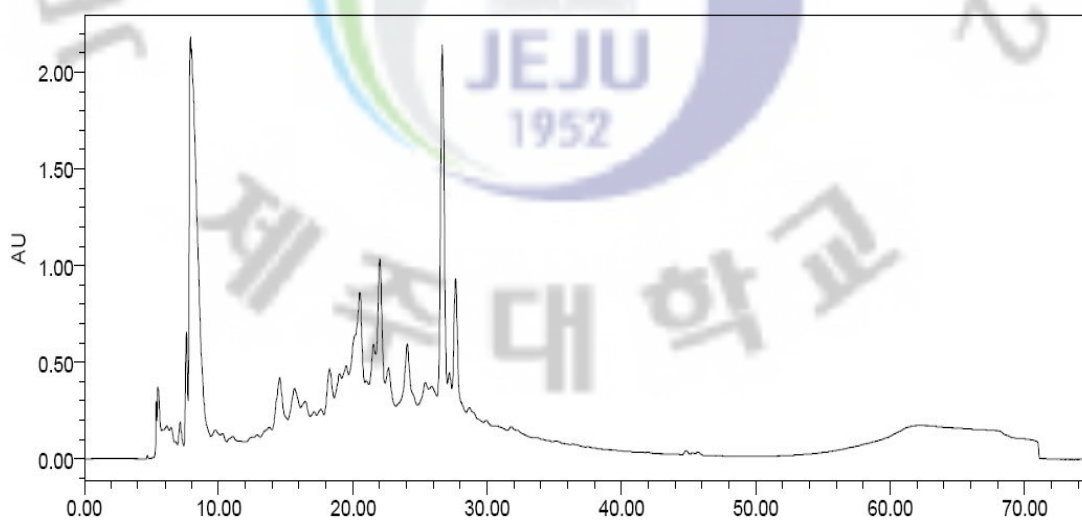


Fig. 2-9. HPLC chromatogram of EtOAc fraction (at 280 nm detection wavelength).



**Fig. 2-10. 2D-contour plot of n-BuOH fraction obtained by PDA detector system.**



**Fig. 2-11. HPLC chromatogram of n-BuOH fraction (at 280 nm detection wavelength).**

### 3-2. 화합물의 구조 결정

용매분획으로부터 얻어진  $\text{CHCl}_3$  분획물을 순상 실리카겔로부터 열린 컬럼 크로마토그래피(open column chromatography)를 이용하여 6 개의 분획물을 획득하였다. 각 분획물은 Semi-prep LC를 이용하여 머무름 시간과 흡광도가 동일한 분획물을 합하여 SS-001 ~ SS-007의 7개의 화합물을 분리하였고, 이를  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR을 사용하여 그 구조들을 동정하였다(Table 2-4, Fig. 2-36).

분리된 화합물 SS-001에 대한  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼을 살펴보면, 9.82(1H, s) ppm의 알데히드 형태의 피크가 관찰되었고, 2개의 ortho, meta-coupling된 이중선 피크(doublet)가 7.8(2H, dd,  $J=8.5, 2.8$  Hz), 6.9(2H, dd,  $J=8.5, 2.8$  Hz) ppm에서 관찰된 것으로 보아 벤젠 고리(Fig. 1-11, A)를 갖는 화합물 구조로 예측되었다(Fig. 2-12).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 190.9 ppm에서 알데히드 탄소가 존재하는 것으로 관찰되었고, 2 개의 4차 탄소(163.3, 128.4 ppm)가 관찰되었다. 또한 132.0, 115.8 ppm에서  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서 예상되는 벤젠고리 형태의 구조가 존재하는 것으로 예측되었고, 이러한 결과로부터(Fig. 2-13), SS-001은 p-hydroxy benzaldehyde로 동정되었다(Han, 2004).

SS-002에 대한  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼을 살펴보면, 3.93 ppm에서 2개의 메톡시기가 서로 대칭인 형태로 존재하는 것으로 예측되었고, 7.25(2H, dd,  $J=2.2$  Hz) ppm의 이중선 피크가 관찰되는 것으로 보아 Fig. 1-11, B의 벤젠고리의 구조로 예측되었다. 9.77(1H, s) ppm에서 알데히드 형태의 피크를 관찰하였다(Fig. 2-14).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 49.4 ppm에서 2개의 메톡시기가 관찰되었고, 192.9 ppm에서 알데히드 탄소가 존재하는 것으로 관찰되었다. 또한 2개의 4차 탄소(144.1, 138.9 ppm)가 관찰되었고, 149.7, 108.3 ppm 피크로 보아 두 개의 대칭인 탄소가 벤젠고리에 결합된 구조를 하고 있음을 유추하였다. 따라서 SS-002는 syringaldehyde임을 예측하였다(Fig. 2-15; Kim, 2003).

SS-003에 대한  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼을 살펴보면, 3.70 ppm에서 1개의 메톡시기가 존재하는 것을 예측하였고, 7.64(2H, d,  $J=7.6$  Hz)와 6.76(2H, d,  $J=7.6$  Hz) ppm이 관찰되는 것으로 보아 Fig. 1-11, A의 형태의 벤젠고리 형태의 이중선 피크로 예측되었다. 또한 6.84(1H, d,  $J=12.6$  Hz)와 5.78(1H, d,  $J=12.6$  Hz) ppm의

이중선 피크로부터 시스-올레핀 형태의 구조가 존재함을 예측하였다(Fig. 2-16).  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 49.4 ppm에서 1개의 메톡시기가 관찰되었고, 168.8 ppm에서 알데히드 피크가 관찰되었다. 160.1 ppm에서는 산소원자에 의해 탈차폐된 4차 탄소를 예상하였고, 127.6 ppm에서도 4차 탄소가 관찰되었다. 또한 133.6 ppm과 115.8 ppm에서 2개의 서로 대칭인 탄소가 관찰되었고(Fig. 2-17), 이러한 NMR 스펙트럼 판독 결과를 종합한 결과, 이 성분은 methyl cis-p-hydroxycinnamate으로 동정하였다(Ayer and Trifonov, 1995).

SS-004는  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼과  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 SS-003과 매우 유사한 피크들이 관찰되었다. 3.76 ppm에서 1개의 메톡시기와 7.63와 6.33 ppm에서 이중선(2H, dd,  $J=9.0, 2.3$  Hz)이 SS-003과 유사한 값을 나타내었다. 하지만 7.45와 6.32의 couplig 상수 값이 15.8 Hz로 SS-003 보다 큰 상수값을 보이는 것으로 보아 트랜스 형태의 올레핀 구조를 예상하였다(Fig. 2-18).  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 SS-003과 모든 피크 형태가 유사하게 나타났다(Fig. 2-19). 따라서 SS-004는 SS-003의 이성질체인 methyl trans-p-hydroxycinnamate으로 동정하였다(Kwon and Kim, 2003).

SS-005는  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 2개의 메틸렌( $-\text{CH}_2-$ ) 피크 3.56(2H, d,  $J=5.8$  Hz), 3.84, 4.14(2H, d,  $J=11.24$  Hz) ppm이 관찰되는 것으로 보아 2,3-dihydroxypropyl기가 존재할 것으로 예측되었고, 5.35 ppm에서 다중선(multiplet) 피크는 2개의 올레핀이 근접하여 있는 구조로 예측되었고, 지방족 체인 피크가 관찰되었다(Fig. 2-20). SS-005의  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 71.1 ppm에서 메틴 탄소와 66.4, 64.1 ppm에서 두 개의 산소원자가 결합된 메틸렌 탄소원자가 관찰되었다. 175.4 ppm에서는 에스터기의 카르보닐 탄소가 관찰되었고, 128.8, 129.2, 131.0, 132.7에서 4개의 올레핀 탄소가 관찰되었다. 또한 12개의 메틸렌 탄소와 한개의 메틸 탄소가 관찰되었다(Fig. 2-21). 따라서 이러한 NMR 스펙트럼 판독 결과를 종합한 결과, 이 성분은 2,3-dihydroxypropyl 9Z, 12Z-octadecadienoate인 것으로 동정하였다(Chung et al., 1995).

SS-006은  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 1.30(6H, s) ppm 그리고 1.59(3H, s) ppm에서 3개의 메틸기 피크가 관찰되었다. 1.43, 2.48 2.02, 4.12 ppm에서 하나의 카르보닐기 수소와 그에 인접한 두 개의 메틸렌 피크의 존재를 확인하였고, 5.79

ppm에서 한 개의 이중결합에 관여하는 수소가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 2-22).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 113.7, 173.9, 183.7 ppm에서  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone에 해당하는 특징적인 피크를 확인하였고, 65.2, 88.5 ppm에서 산소가 결합된 탄소의 피크를 확인하였다. 이 화합물이  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone, 카르보닐기 탄소, 2개의 메틸렌 탄소 그리고 3개의 tertiary 메틸기로 구성된 2환 구조임을 추정할 수 있었다(Fig. 2-23). 따라서 이를 문헌의 선행연구와 비교하여 (+)-(6S, 7aS)-epilolide임을 확인할 수 있었다(박기의 등, 2004).

SS-007은 SS-006과 상호 매우 유사한 스펙트럼을 보였다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 1.26, 1.45, 1.74 ppm에서 3개의 메틸기와 5.73 ppm의 이중 결합된 수소가 확인되었다. 또한 2.42, 1.99, 1.53 ppm에서 메틸렌 피크가 관찰되었다(Fig. 2-24).  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 SS-006의 동일한 위치에 탄소 피크가 나타났다. 다만 SS-006에서 49.6, 50.7 ppm에서 나타났던 피크가 좀 더 차폐된 47.9 ppm과 48.4ppm에서 확인되었다. 따라서 (-)-(6R, 7aS)-Ioliolide임을 추정할 수 있었고 (Fig. 2-25), 이러한 결과는 선행연구와도 일치하였다(박기의 등, 2004).

용매분획으로부터 얻어진 EtOAc 분획물은 순상실리카겔을 충전한 관 크로마토그래피법으로 6 개의 분획물을 수집하였다. 각 분획물은  $\text{CHCl}_3$  분획물과 같은 방법으로 Semi-prep LC를 이용하여 SS-008 ~ SS-012의 5개의 화합물을 분리하였고,  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR을 사용하여 그 구조들을 동정하였다(Table 2-4, Fig. 2-36).

먼저 SS-008의  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 7.31과 6.79(2H, d,  $J=8.5$  Hz) ppm의 피크가 관찰되는 것으로 보아 Fig. 1-11, A의 벤젠고리 형태의 구조가 존재하는 것으로 추측되었고, 또한 5.87(2H, d,  $J=5.8$  Hz) ppm은 방향족 수소가 존재할 것이라고 예측되었다. 그리고 2.68, 3.24, 5.44 ppm에서 aglycone 형태의 수소 피크가 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서는 196.3 ppm에서 카르보닐 피크가 관찰되었고, 4개의 산소원자가 결합된 형태의 탄소 피크도 관찰되었다. 또한 123.3과 115.1 ppm에서 Fig. 1-11, A의 구조가 예상되었고, 이는  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼의 예측된 구조와도 일치하였다(Fig. 2-26). 또한  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서 나머지 피크의 화학적 이동값(128.8, 101.7, 95.8, 94.9, 73.4, 39.7 ppm)을 상대 비교해 본 결과, 플라보노이드 형태의 구조를 갖는 화합물임을 예측할 수 있었고(Fig. 2-27),

선행연구와 비교하여 naringenin인 것으로 확인되었다(Mizobuchi and Sato, 1984).

SS-009은  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 7.89(1H, d,  $J=15.8$  Hz) ppm과 6.63(1H, d,  $J=15.8$  Hz) ppm의 피크가 관찰되는 것으로 보아 트랜스 형태의 올레핀 구조가 존재하는 것으로 보이며 7.69, 7.16(2H, d,  $J=8.5$  Hz) ppm와 7.06(2H, s) ppm에서 피크가 관찰되는 것으로 보아 각각 Fig. 1-11의 A와 B 형태의 방향족 구조가 존재하는 것으로 예측되었다. 또한 3.98 ppm에서 2개의 서로 대칭인 상태에 놓여 있는 메톡시기가 관찰되었고, 3.67 ~ 4.21 ppm 사이의 피크로 보아 배당체가 존재하는 화합물로 예측할 수 있었다. 그리고 다중선 형태의 couplig을 보이는 피크가 2.49와 2.69 ppm에서 관찰되는 것으로 보아 2개의 메틸렌탄소가 존재하는 것으로 추측되었다(Fig. 2-28).  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 카르보닐 피크가 169.3 ppm에서 관찰되었고, 35.4 ~ 103.5 ppm에서는 산소원자의 영향을 받는 탄소가 있음을 알 수 있었으며, 이는 배당체와 관련된 피크임을 예측할 수 있었다. 또한 56.8 ppm에서는 두 개의 메톡시기 탄소가 존재하는 것으로 예측되었다. 또한 105.4 ~ 161.3 ppm 사이에 관찰되는 피크에서는  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 유추한 두 개의 방향족 형태의 구조가 존재하는 것으로 사료되며, 161.3 ppm에서는 히드록시기의 산소원자가 결합된 형태의 탄소가 존재하는 것을 예측할 수 있었다. 관찰된 피크를 토대로 예측된 구조를 문헌의 결과와 비교한 결과 SS-009(Fig. 2-29) 화합물은 3-O-*p*-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-O- $\beta$ -glucopyranosylpropanol인 것으로 유추하였다(Sultana and Lee, 2009, 2010).

SS-010은 조릿대에서 많이 분리되는 tricin과 매우 유사한 피크로 관찰되었다(Sakai et al., 2008). 먼저  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 7.55(2H, d,  $J=15.8$  Hz) ppm에서 Fig. 1-11의 B의 구조로 예측할 수 있었고, 6.93과 6.46(1H, d,  $J=2.1$  Hz) ppm에서 피크가 관찰되는 것으로 보아, 방향족 고리에서 meta-coupling을 하는 것으로 예측되었다(Fig. 2-30). 또한 4.64, 5.04, 5.16, 5.40 ppm에서 피크가 관찰되는 것으로 보아 배당체가 존재하는 것으로 예측되었다. 그리고 2개의 메톡시기가 관찰되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서는 카르보닐기 피크가 182.1 ppm에서 관찰되었고, 60.6, 69.6, 73.1, 76.5, 77.3, 100.1 ppm에서 배당체의 탄소가 관찰되었다. 또한 2개의 메톡시기는 56.4 ppm에서 관찰되었다. 그리고 95.3 ~ 163.0 ppm에서 플라

보노이드에서 관찰되는 형태의 특정 피크를 관찰할 수 있었다(Fig. 2-31). 따라서 SS-010은 tricinin에 glucoside가 결합된 구조로 판단하였고, 선행연구와 비교해 본 결과 tricinin 7-O-β-D-glucopyranoside로 동정하였다(Sultana and Lee, 2009, 2010).

SS-011의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서는 7.62, 6.32ppm에서 couplig 상수 값이 15.8와 5.0 Hz를 나타내는 것으로 보아 한 개의 트랜스 형태의 올레핀이 존재하는 것으로 예측되었고, 7.47(2H, dd, J=8.5, 3.0 Hz) ppm과 6.82(2H, dd, J=8.5, 3.0 Hz) ppm에서는 벤젠고리 형태의 Fig. 1-11의 A의 구조가 존재하는 것으로 예측되었다(Fig. 2-32). <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서는 179.2 ppm에서 카르보닐 탄소가 존재하는 것으로 관찰되었고, 161.1 ppm에서는 산소가 결합된 형태의 벤젠고리의 구조가 예상되었다(Fig. 2-33). 이러한 결과로부터 SS-011은 *p*-coumaric acid로 동정하였고, 선행연구와 비교하여 동일한 결과를 얻을 수 있었다(An et al., 2008).

SS-012의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서는 7.68 ppm에서는 이중선 피크의 couplig이 관찰되었고, 7.13(1H, m)과 6.61(2H, m) ppm에서는 다중선 couplig이 관찰되는 것으로 보아 벤젠고리의 탄소에 4개의 수소 원자가 연속적으로 couplig된 구조를 갖는 것으로 예측되었다(Fig. 2-34). <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서는 171.7 ppm에서 카르보닐 탄소가 존재하는 것으로 관찰되었고, 162.8 ppm에서는 산소가 결합된 형태의 벤젠고리의 구조가 예상되었다(Fig. 2-35). 이러한 NMR 스펙트럼을 선행연구와 비교해본 결과 salicylic acid와 유사한 구조를 나타내었다(정태영, 1994).

n-BuOH 분획물에서는 주사기 컬럼 시스템을 사용하여 여과한 후, Semi-prep LC를 이용하여 1개의 화합물을 분리하였으나, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼과 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 분석결과 SS-008과 동일한 화합물로 동정되었다.



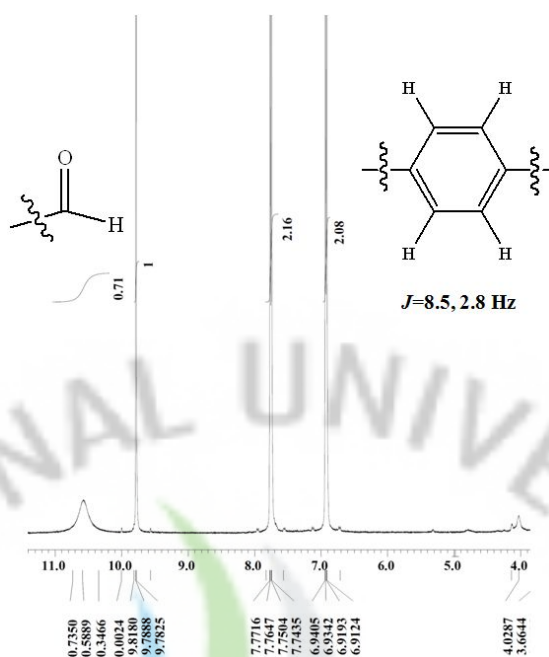


Fig. 2-12.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-001 in  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

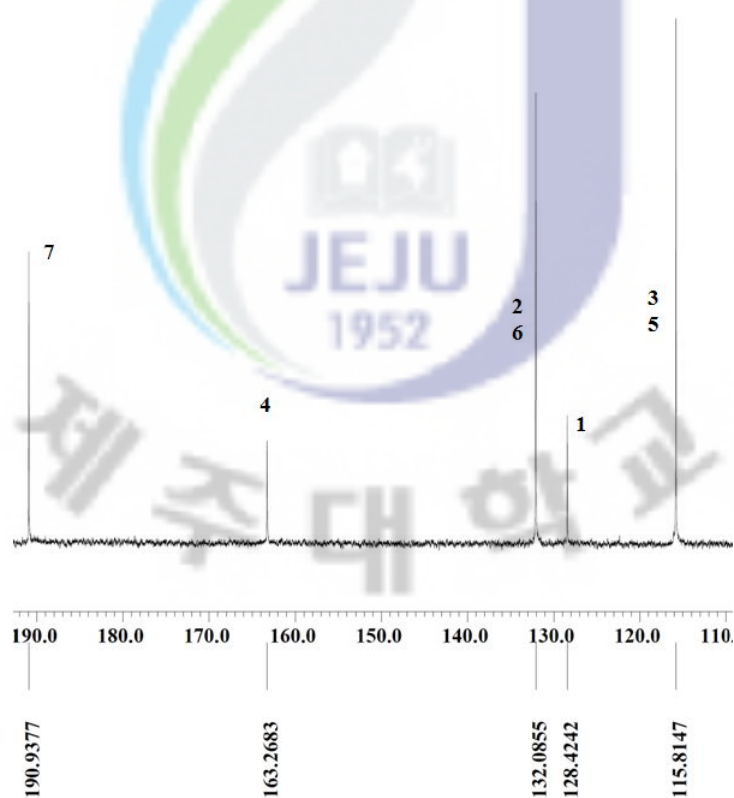


Fig. 2-13.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-001 in  $\text{DMSO-d}_6$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

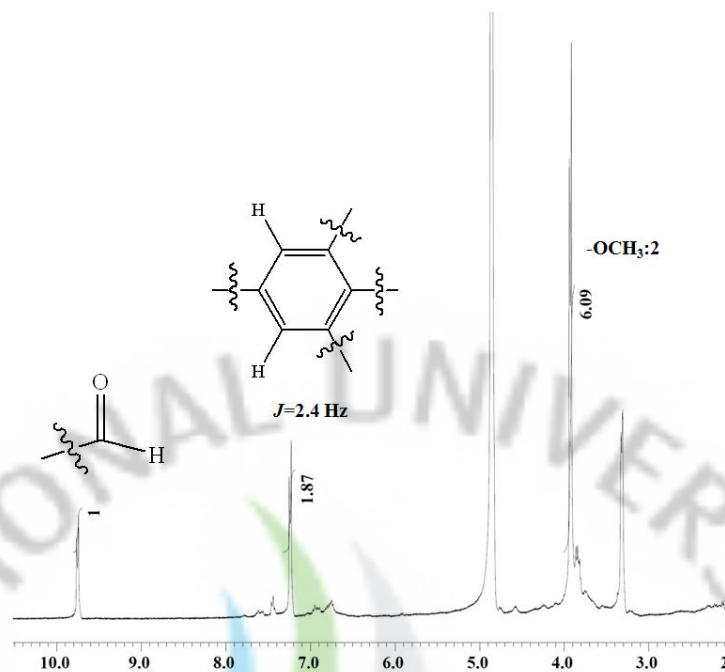


Fig. 2-14.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-002 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

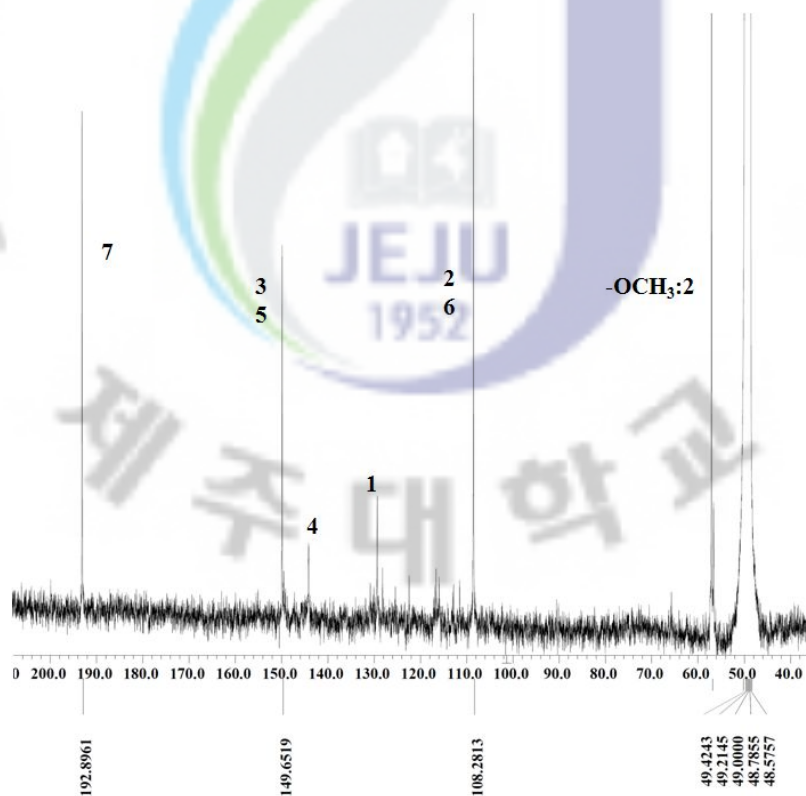


Fig. 2-15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-002 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

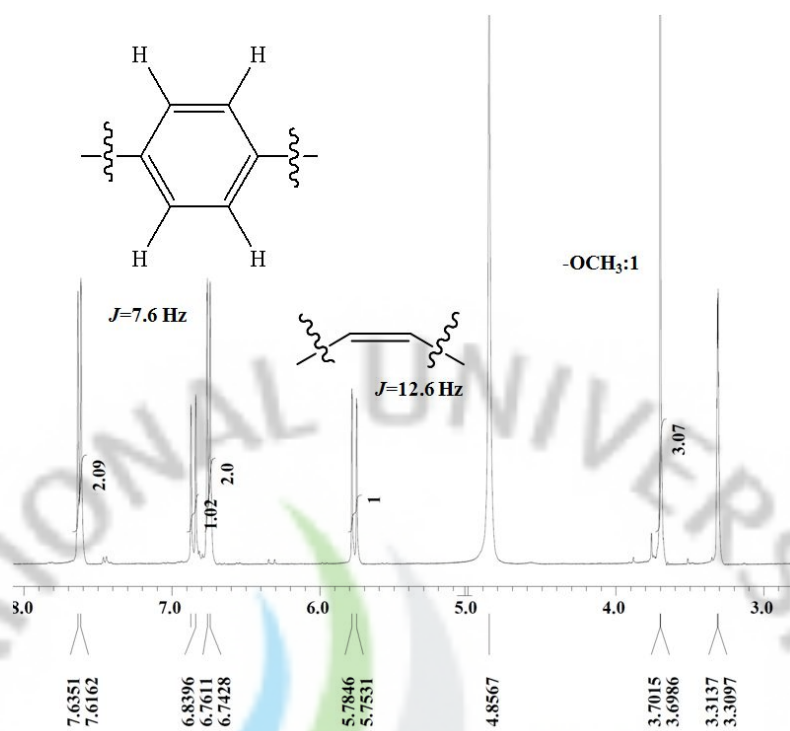


Fig. 2-16.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-003 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

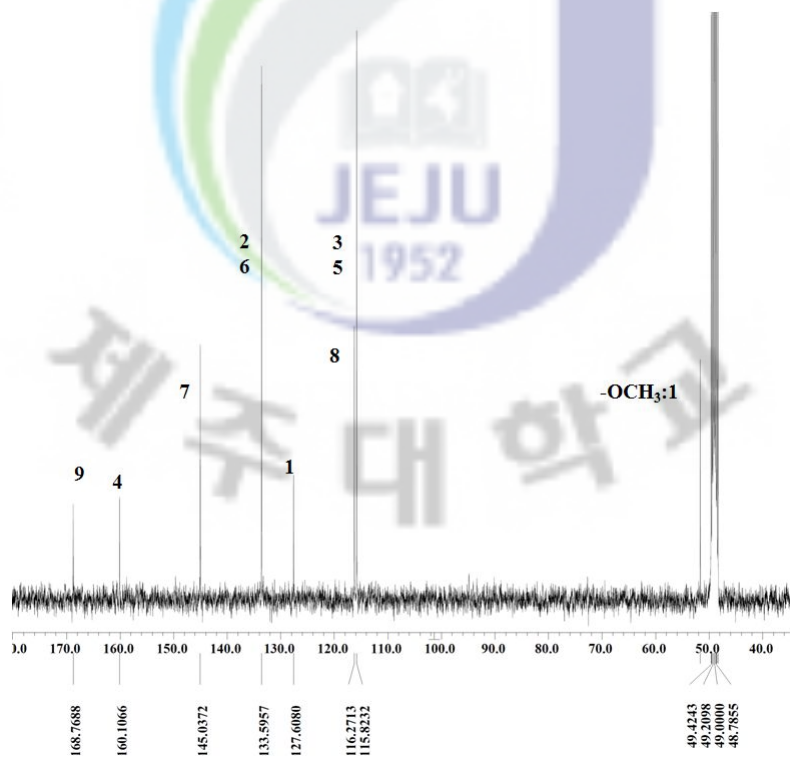


Fig. 2-17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-003 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

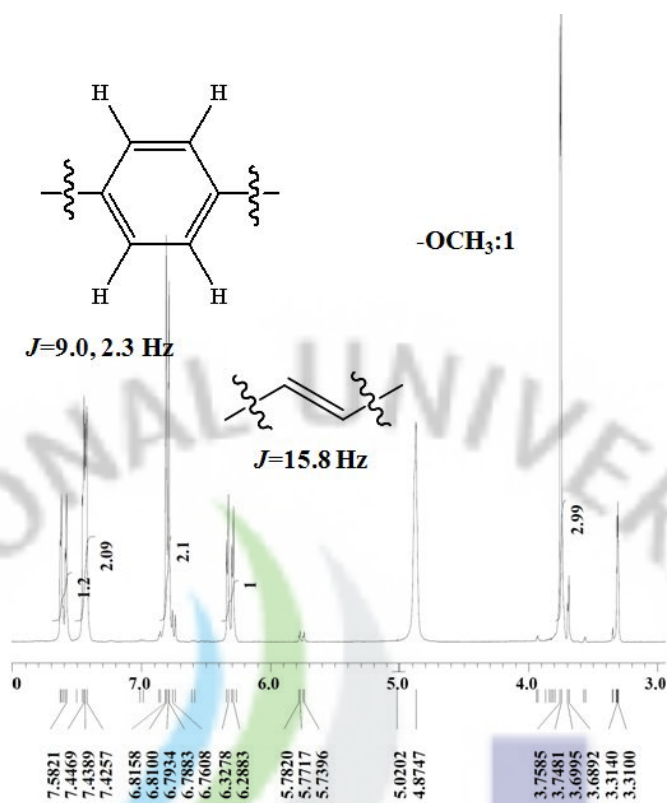


Fig. 2-18.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of SS-004 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

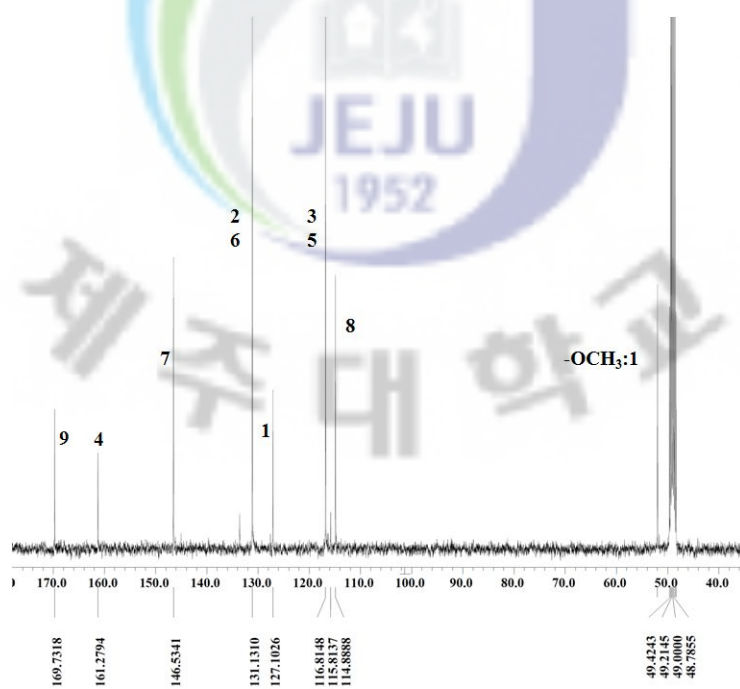


Fig. 2-19.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of SS-004 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

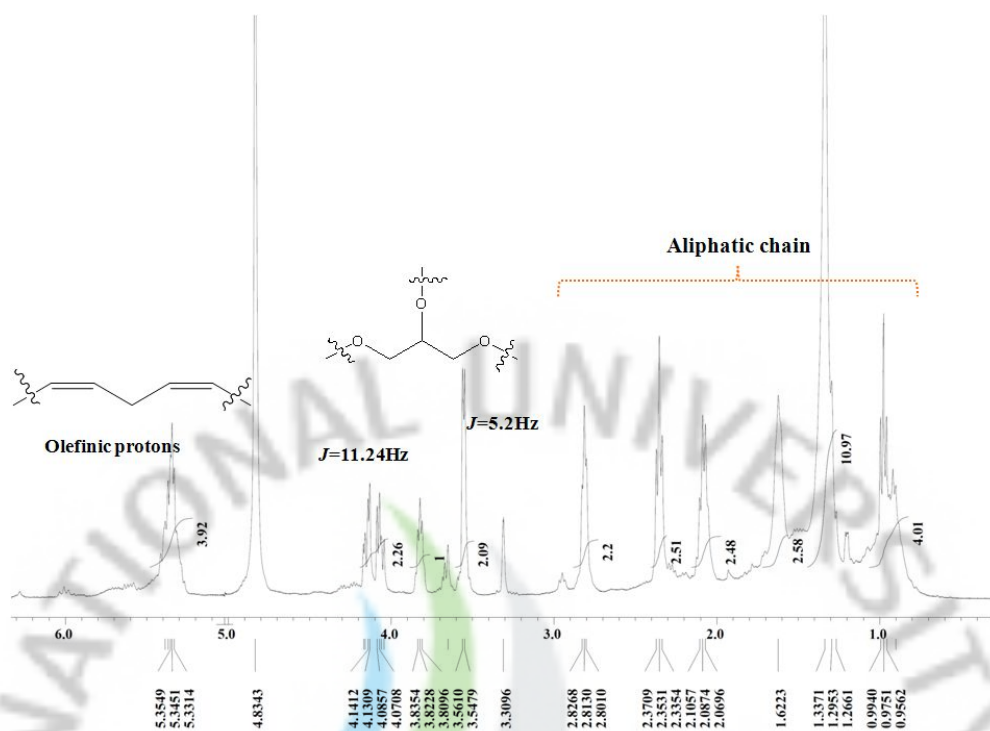


Fig. 2-20.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-005 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

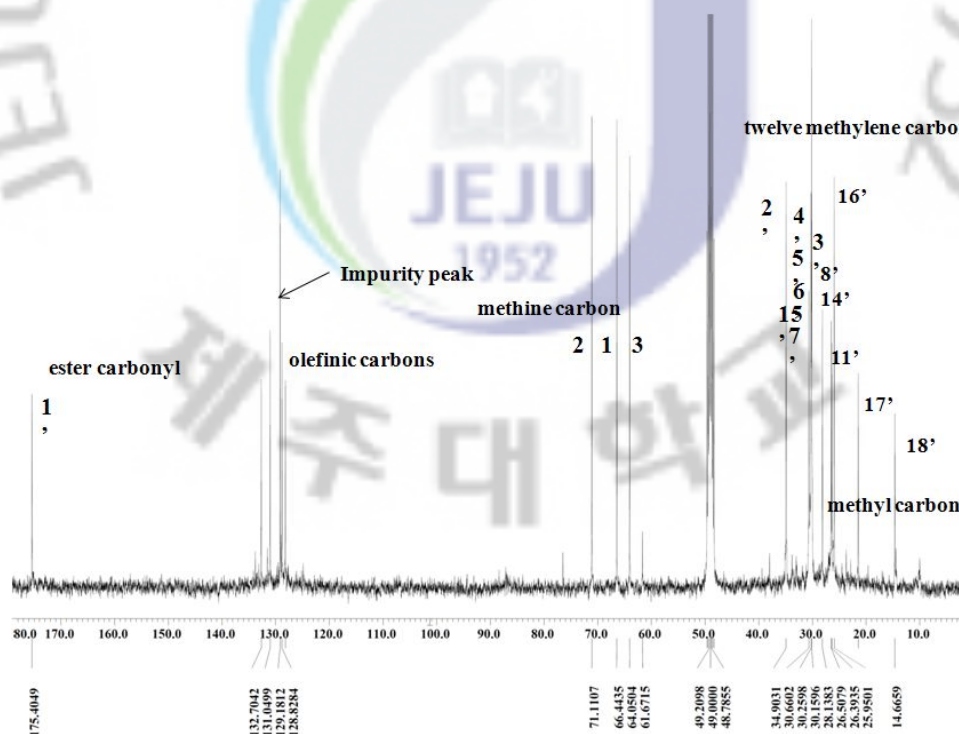


Fig. 2-21.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-005 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

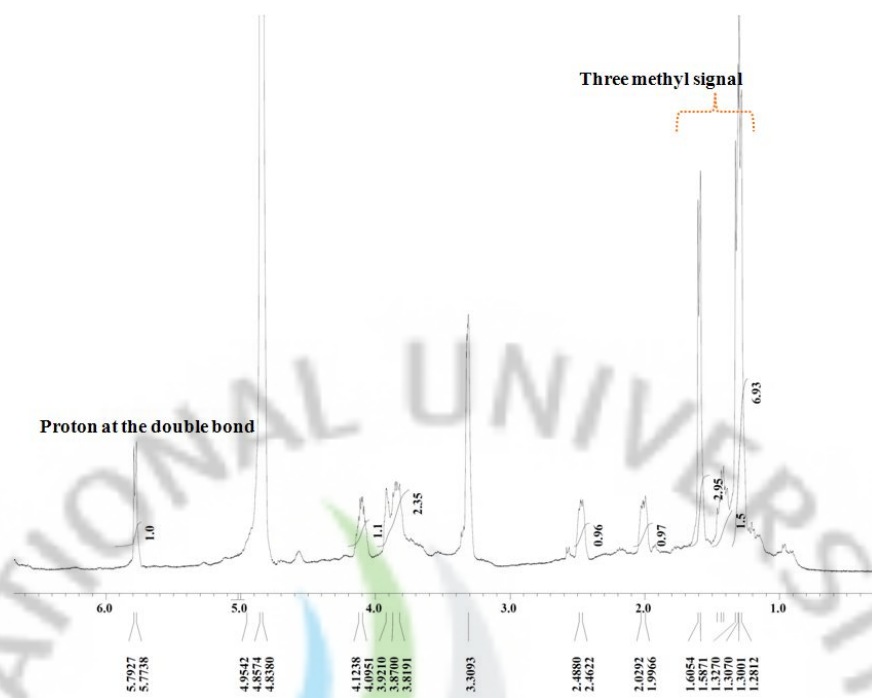


Fig. 2-22.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-006 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

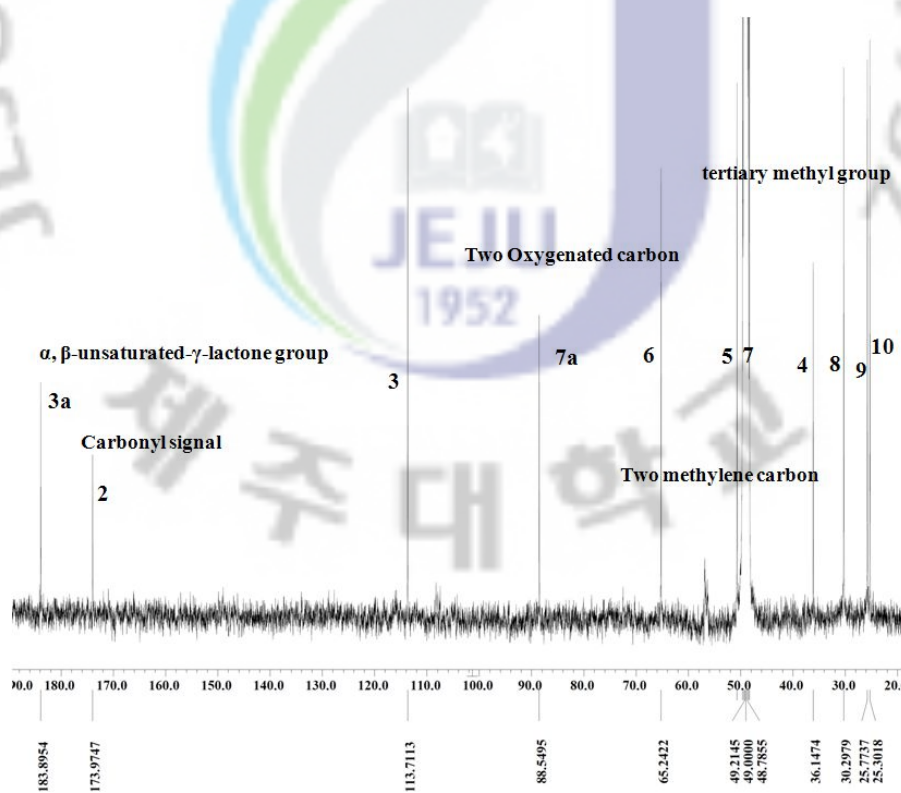


Fig. 2-23.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-006 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

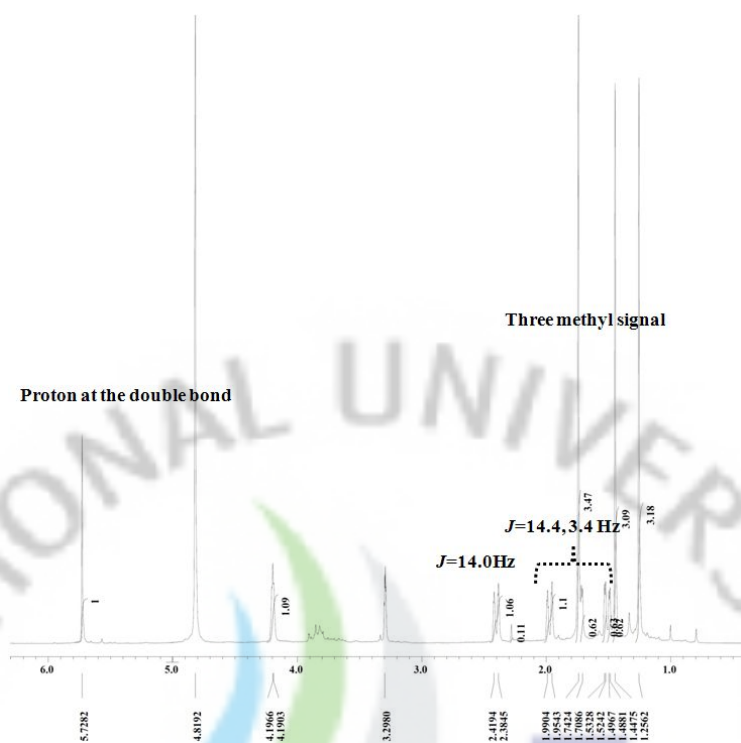


Fig. 2-24.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-007 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

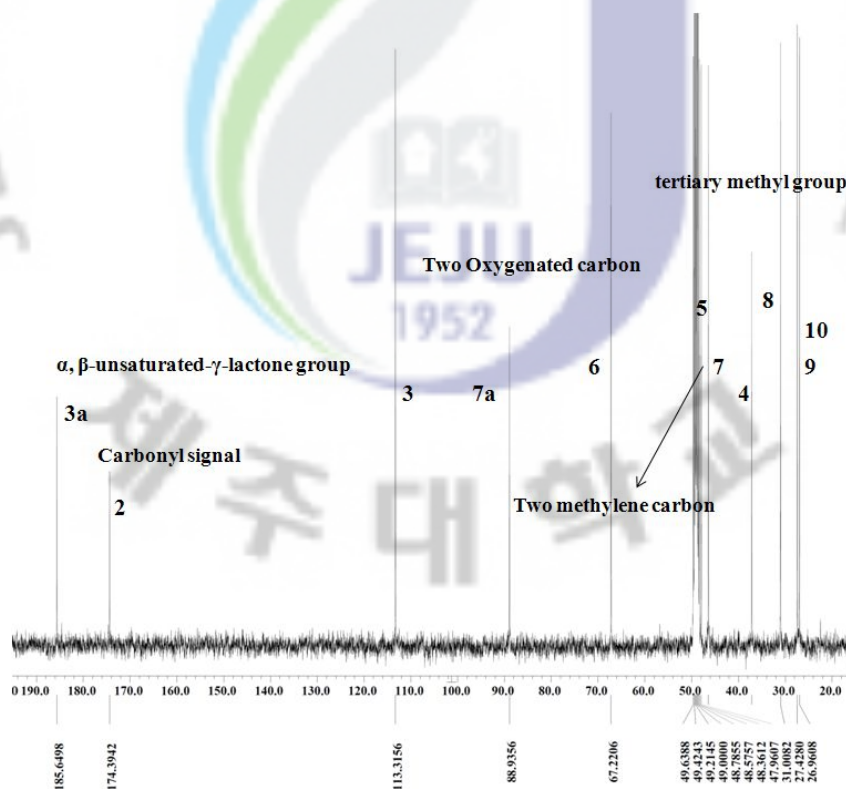


Fig. 2-25.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-007 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

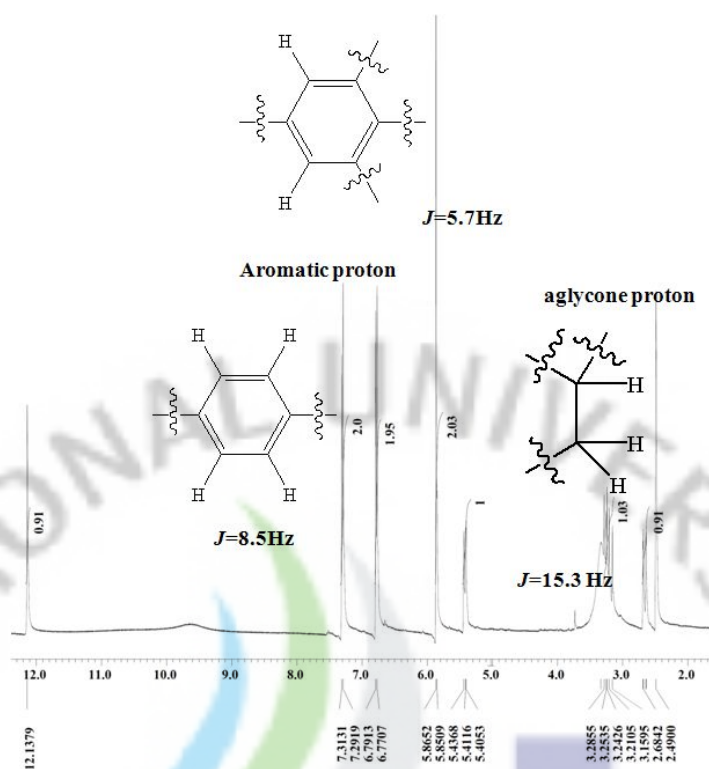


Fig. 2-26.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-008 in  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

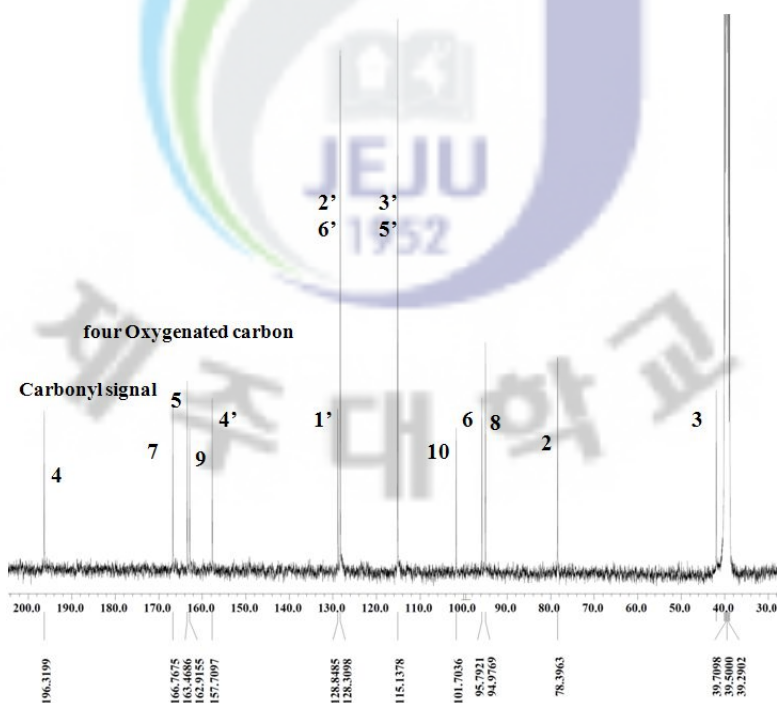


Fig. 2-27.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-008 in  $\text{DMSO-d}_6$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).



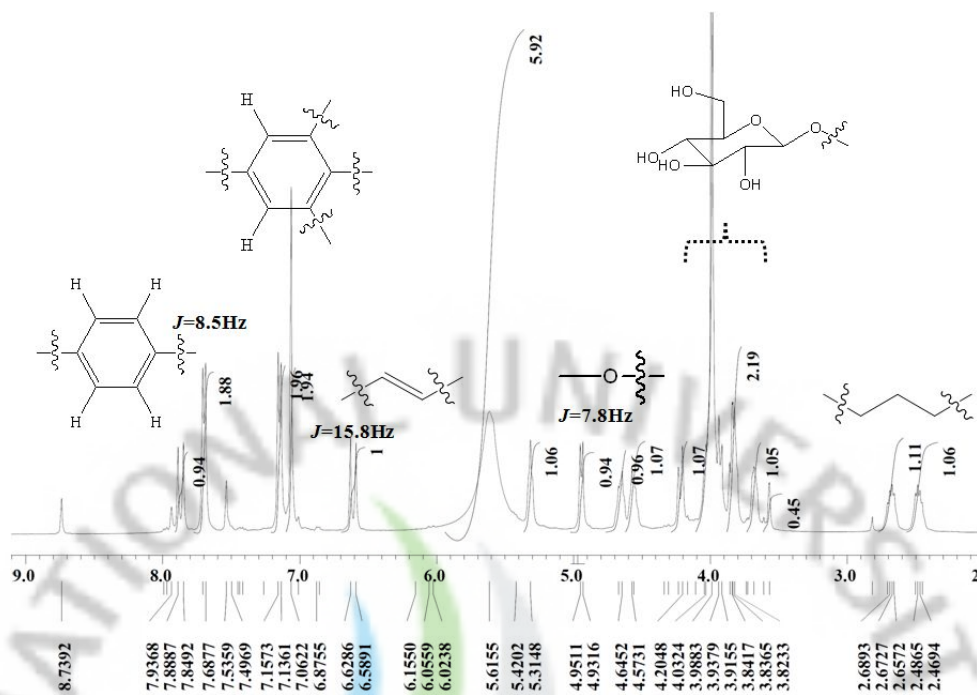


Fig. 2-28.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-009 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

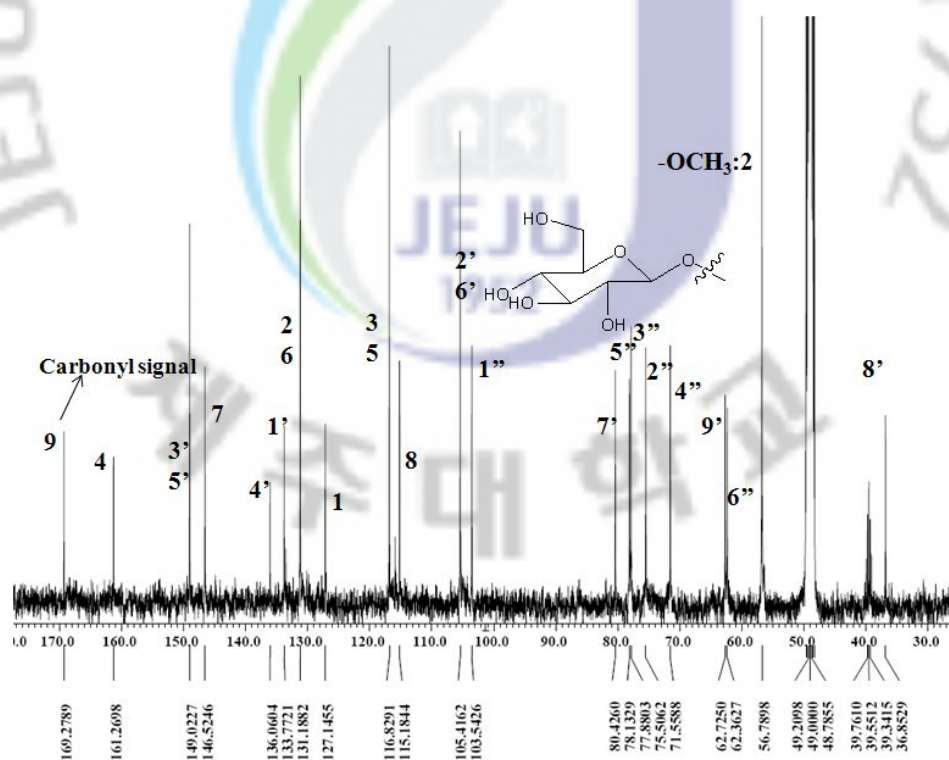


Fig. 2-29.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-009 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

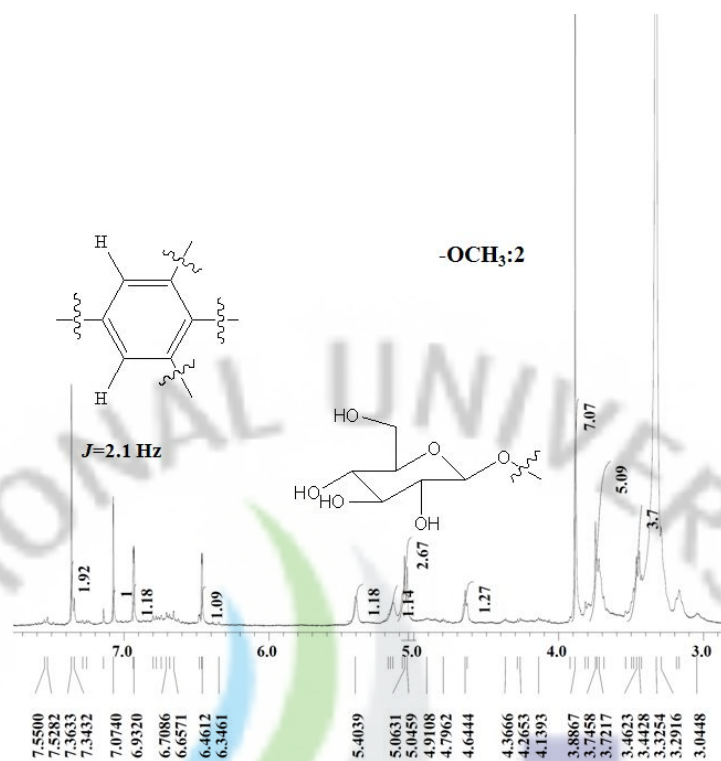


Fig. 2-30.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of SS-010 in  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

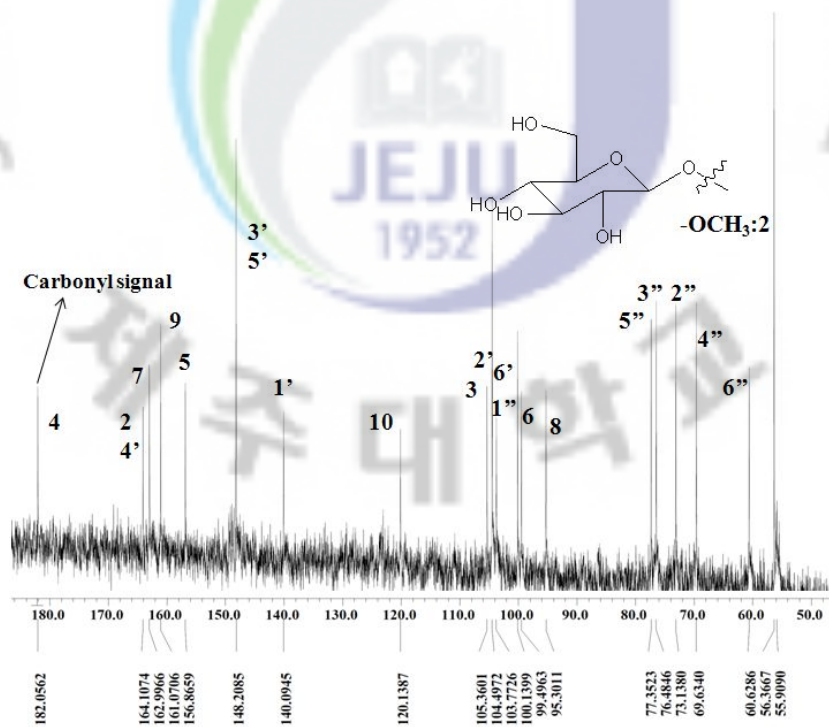


Fig. 2-31.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of SS-010 in  $\text{DMSO-d}_6$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

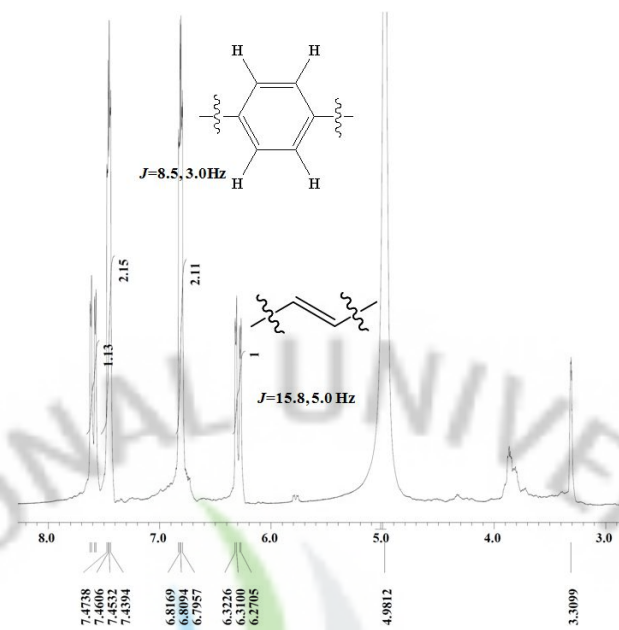


Fig. 2-32.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-011 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

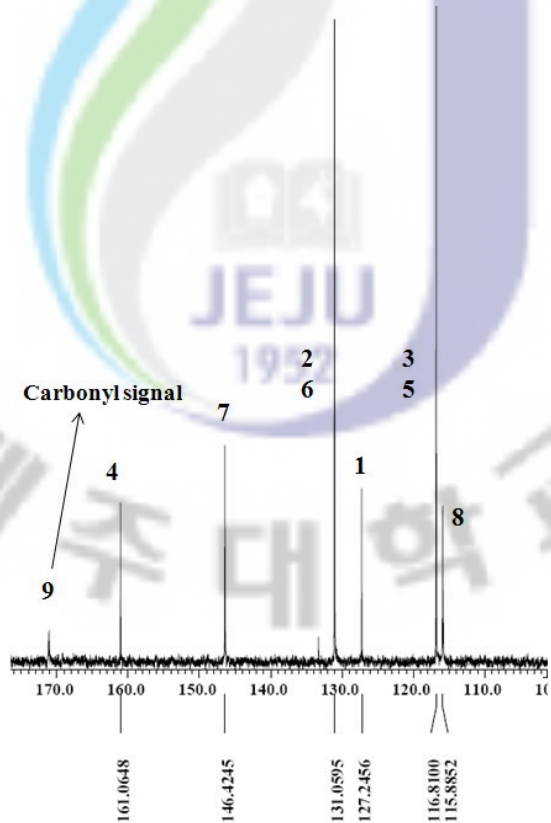


Fig. 2-33.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-011 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

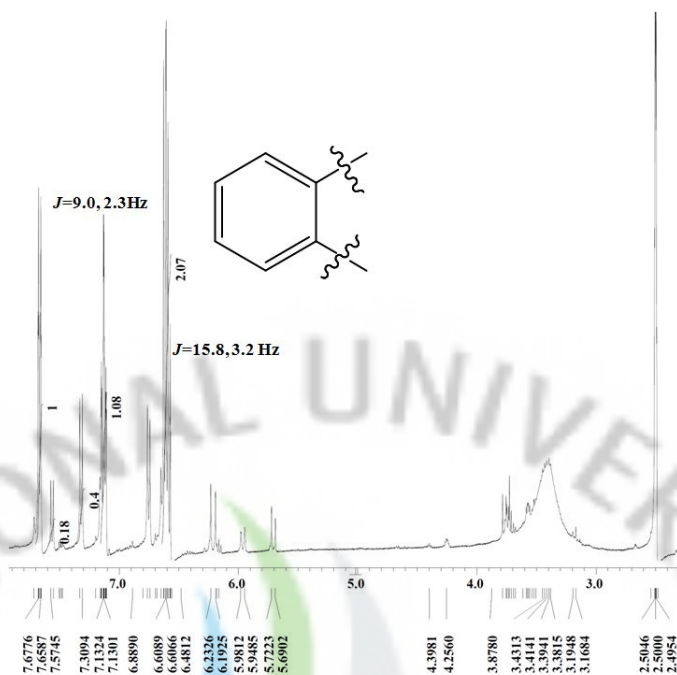


Fig. 2-34.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of SS-012 in  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz for  $^1\text{H}$ ).

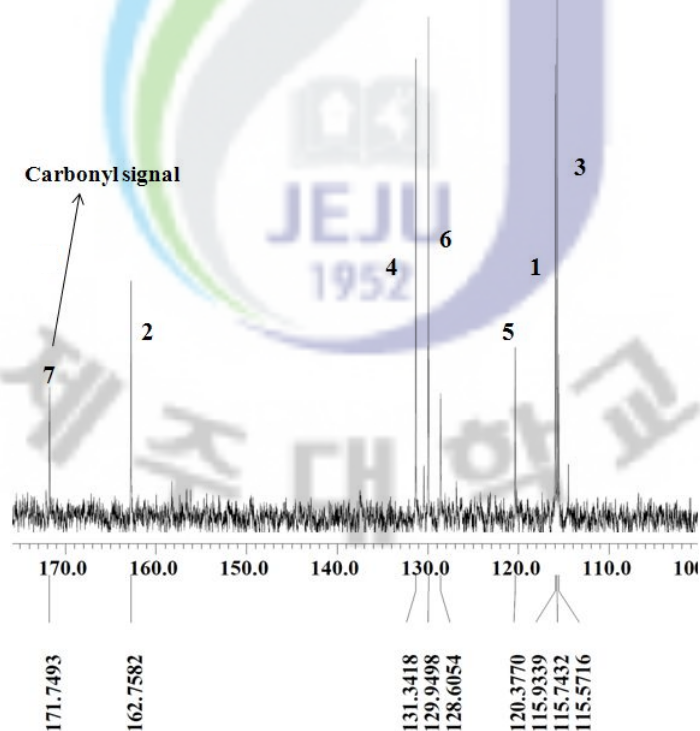


Fig. 2-35.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of SS-012 in  $\text{DMSO-d}_6$  (100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

Table. 2-4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum data of phytochemicals isolated from *S. quelpaertensis* ( $\delta$ , ppm).

C.N	SS-001	SS-002	SS-003	SS-004	SS-006	SS-007	SS-008	SS-009	SS-010	SS-011	SS-012
1	128.4	129.2	127.6	127.1	-	-	-	127.1	-	127.2	115.9
2	132.1	108.3	133.6	131.1	174.0	174.4	78.4	131.2	164.1	131.1	162.8
3	115.8	149.7	115.8	116.8	113.7	113.3	42.1	116.8	105.4	116.8	115.6
4	163.3	143.8	160.1	161.3	36.1	36.9	196.3	161.3	182.1	161.1	131.3
5	115.8	149.7	115.8	116.8	50.7	48.4	163.5	116.8	156.9	116.8	120.4
6	132.1	108.3	133.6	131.1	65.2	67.2	95.8	131.2	99.5	131.1	129.9
7	190.9	192.9	145.0	146.5	49.6	49.6	166.7	146.5	163.0	146.2	171.7
8			116.3	114.9	30.3	50.7	128.3	115.2	95.3	115.9	
9			168.8	169.3	35.8	27.4	162.9	169.3	161.1	172.1	
10					35.3	27.0	101.7	-	120.1		
1'							128.8	133.8	140.1		
2'							128.3	105.4	104.5		
3'							115.1	149.0	148.2		
4'							157.7	136.1	164.1		
5'							115.1	149.0	148.2		
6'							128.3	105.4	104.5		
7'								80.4			
8'								36.9			
9'								62.7			
1''								103.5''	103.8		
2''								75.5	73.1		
3''								77.8	76.5		
4''								71.6	69.6		
5''								78.1	77.3		
6''								62.4	60.6		
-		56.4(3-OMe)	51.8(9-OMe)	51.9(9-OMe)	185.9(3a)	185.6(3a)					
-		56.4(5-OMe)			88.5(7a)	88.3(7a)					
SS-005	66.4(C-1), 71.7(C-2), 64.1(C-3), 175.4(C-1'), 34.9(C-2'), 28.1(C-3'), 30.2(C-4'), 30.2(C-5'), 30.3(C-6'), 30.7(C-7'), 26.4(C-8'), 129.2(C-9'), 132.7(C-10'), 26.4(C-11'), 131.0(C-12'), 127.8(C-13'), 26.4(C-14'), 30.3(C-15'), 26.0(C-16'), 21.8(C-17'), 14.7(C-18'),										

C.N., Carbon Number.

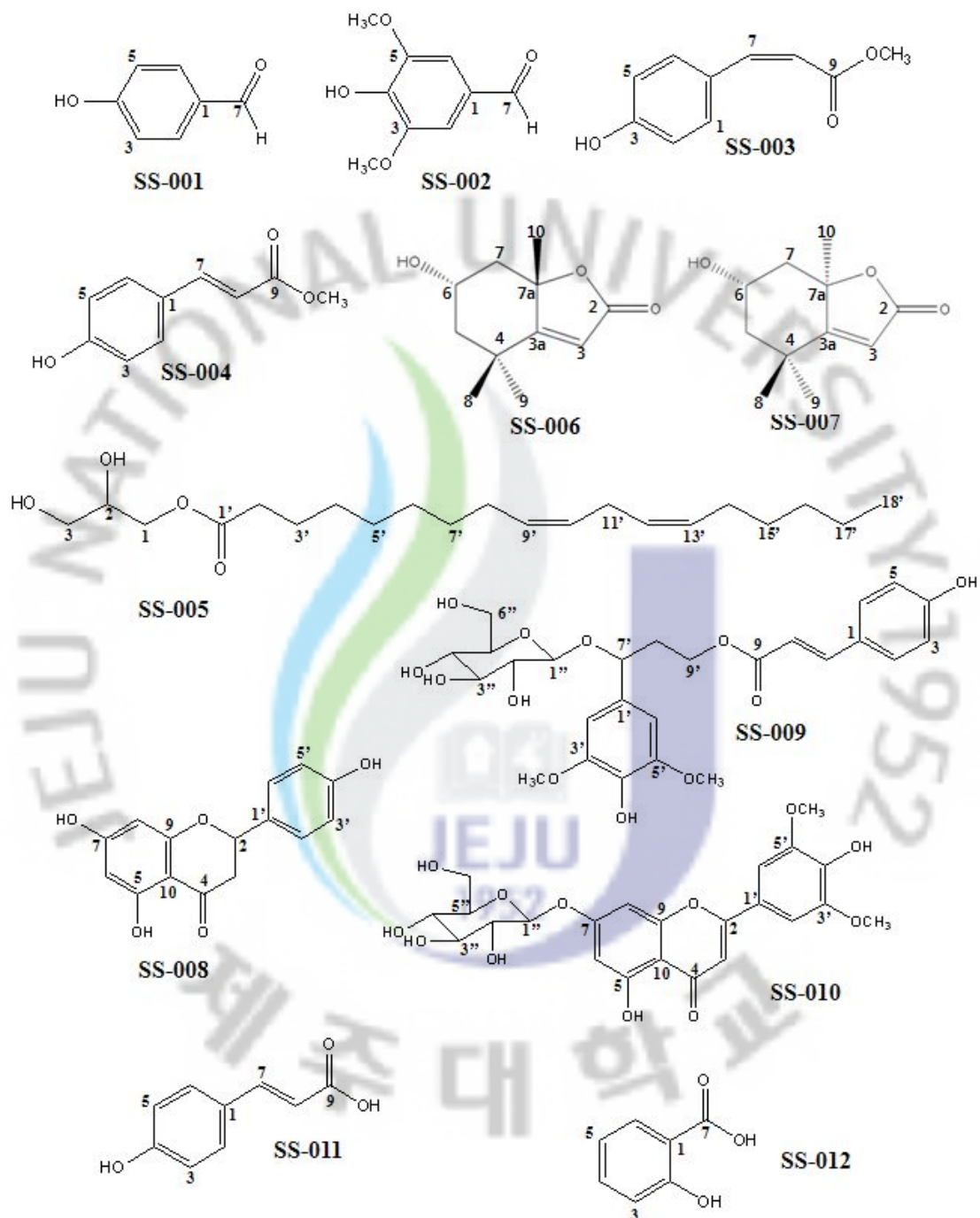


Fig. 2-36. Chemical structure of phytochemicals isolated from *S. quepaertensis*.

### 3-3. DPPH 라디칼 소거 활성

제주조릿대로부터 분리된 12 종의 화합물(SS-001 ~ SS-012)의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과, SS-009와 SS-010이 대조군인 BHA, Ascorbic acid보다는 활성이 떨어지지만, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 보이는 것을 관찰되었다. 그리고 SS-009는 100  $\mu$ M 농도에서 43.7%의 DPPH 라디칼 소거능을 보여 SS-010(16.6%)보다 높은 활성을 나타내었다(Fig 2-37).

### 3-4. NO 생성 저해 활성

제주조릿대로부터 분리된 12개의 성분들의 NO 생성 저해 활성 살펴보기 위해 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하였고, 이로부터 생성된 NO의 저해활성을 확인하였다. 또한 투여된 화합물의 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 12개의 화합물 중 SS-005는 농도 의존적으로 RAW 세포에서 생성된 NO를 억제하는 효과를 나타내었고, 100  $\mu$ M 농도에서는 생성된 NO를 모두 저해하는 것으로 나타나 뛰어난 NO 소거능을 갖는 화합물임을 확인하였다. 또한 SS-005가 처리된 세포에서의 세포독성은 나타나지 않았고(Fig 2-30), SS-003, SS-009, SS-010 성분도 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해하는 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 그리고 MTT assay 결과에서 처리된 모든 성분이 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig 2-38 ~ 2-49).

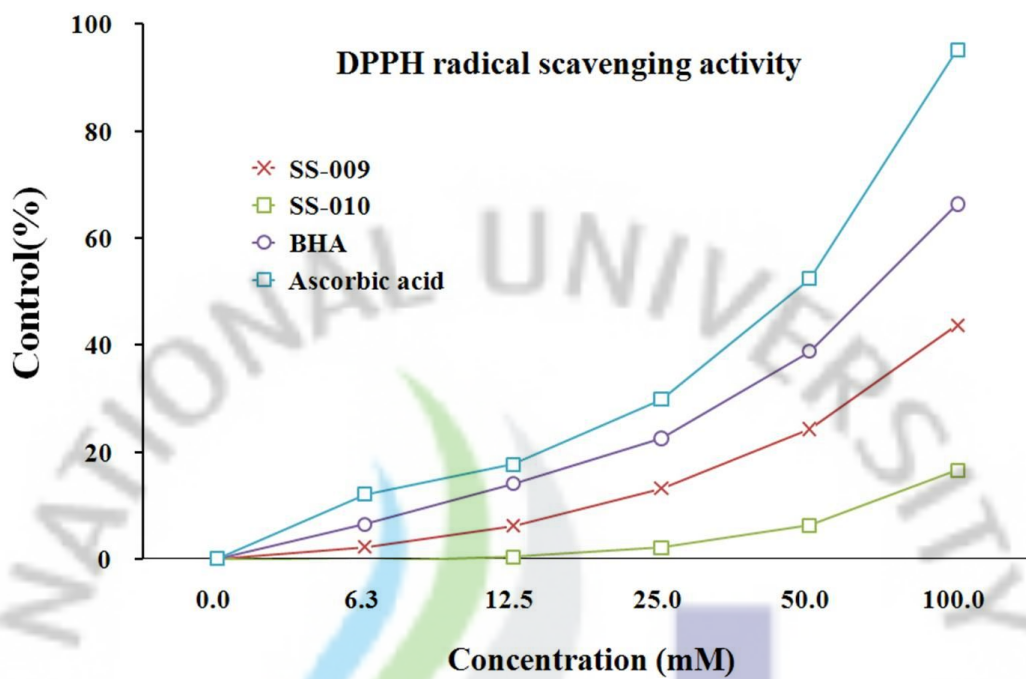
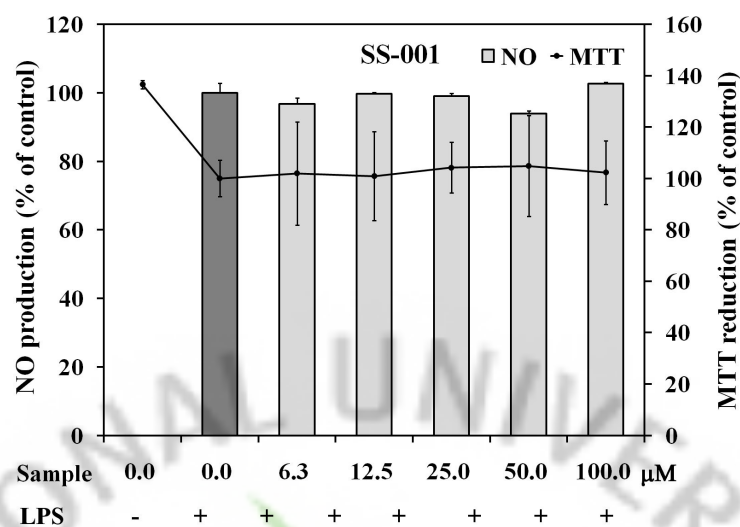
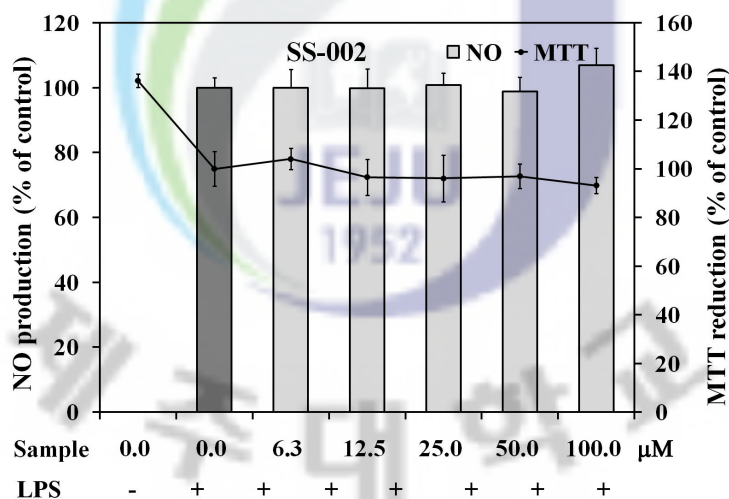


Fig. 2-37. Free radical scavenging activity of compounds isolated from *S. queipaertensis* in DPPH assay experiment.

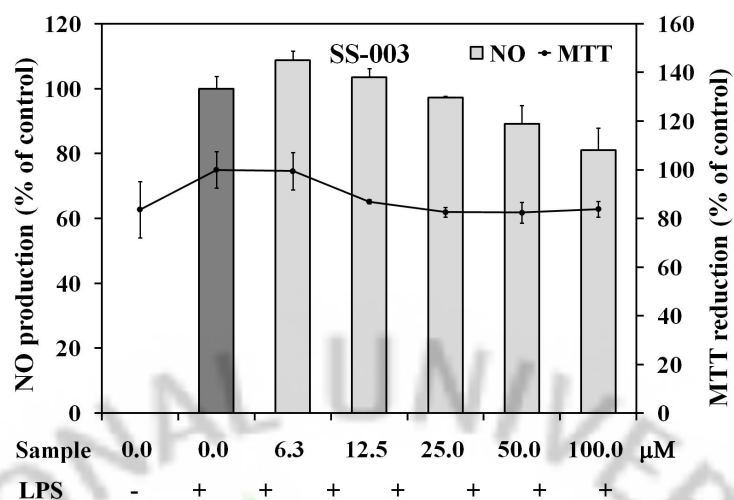




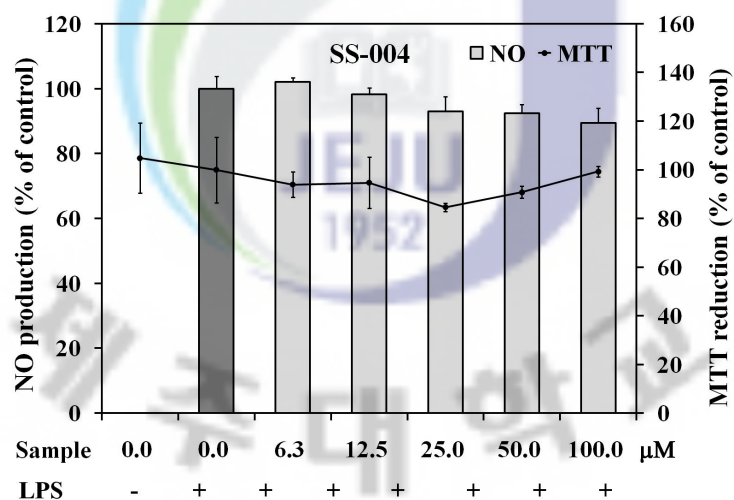
**Fig. 2-38. Effect of SS-001 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



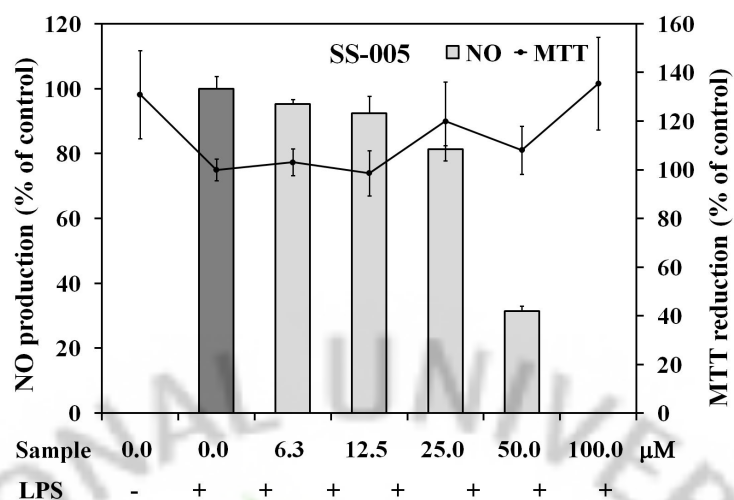
**Fig. 2-39. Effect of SS-002 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



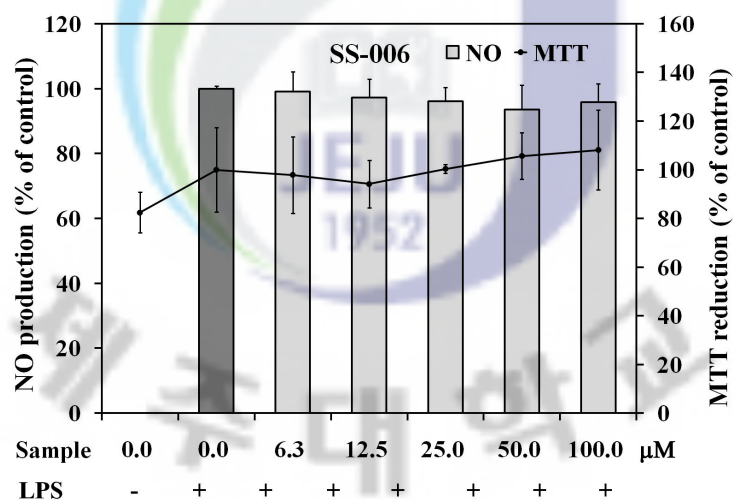
**Fig. 2-40. Effect of SS-003 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 2-41. Effect of SS-004 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 2-42. Effect of SS-005 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 2-43. Effect of SS-006 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

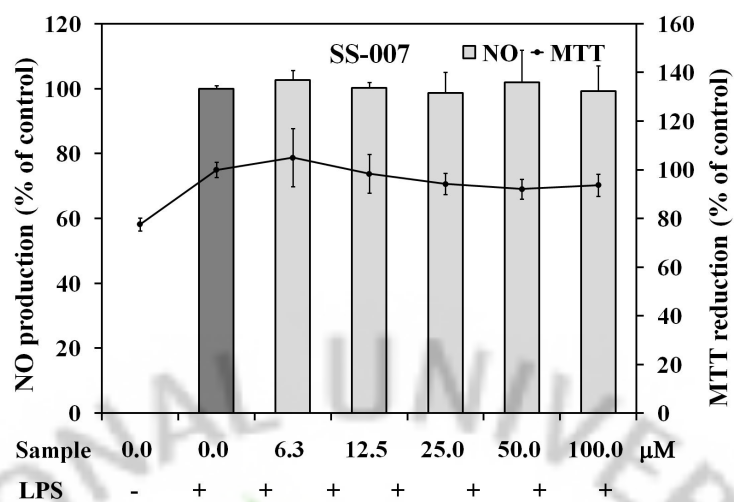


Fig. 2-44. Effect of SS-007 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

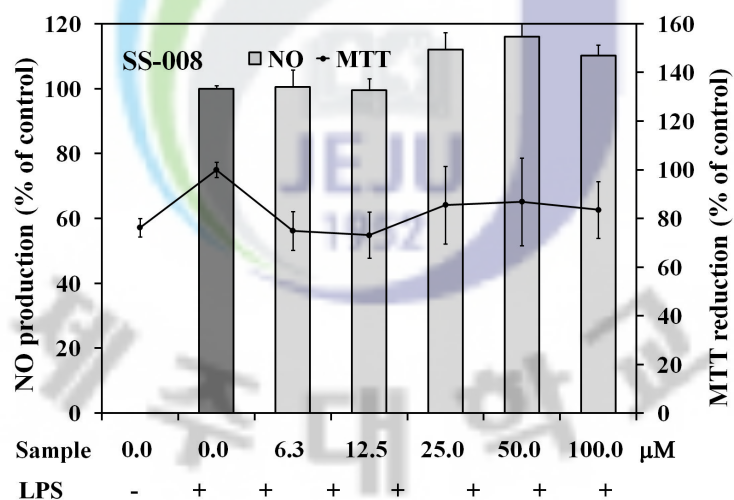


Fig. 2-45. Effect of SS-008 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

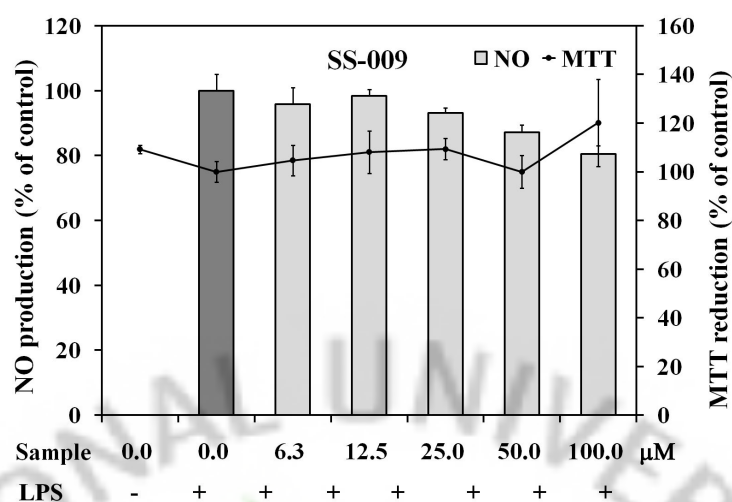


Fig. 2-46. Effect of SS-009 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

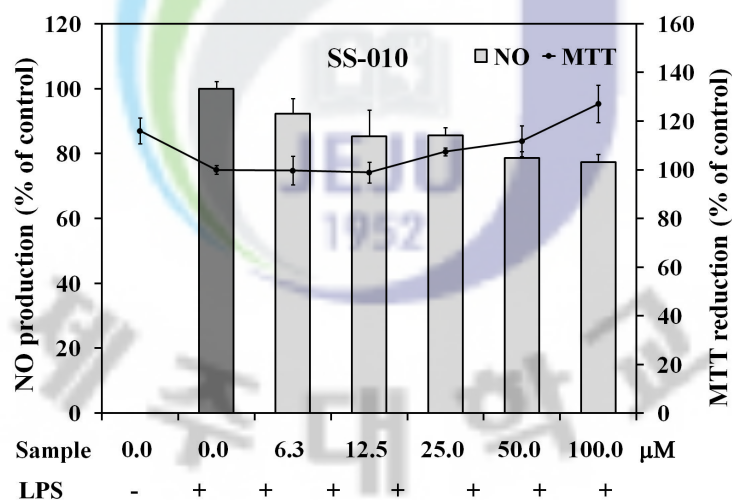
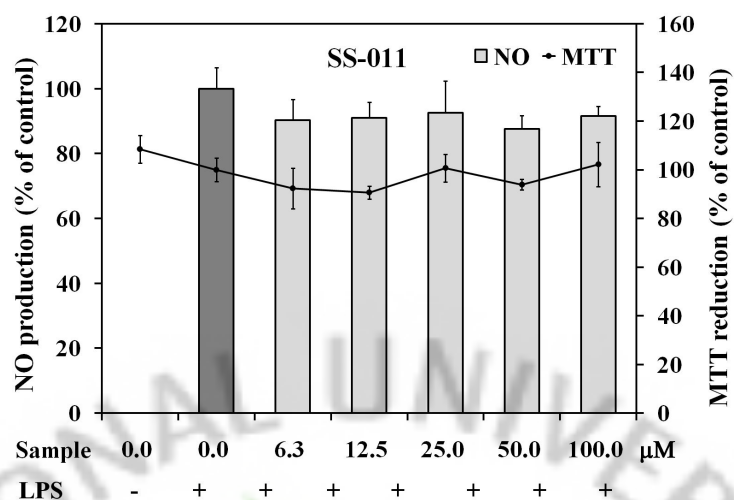
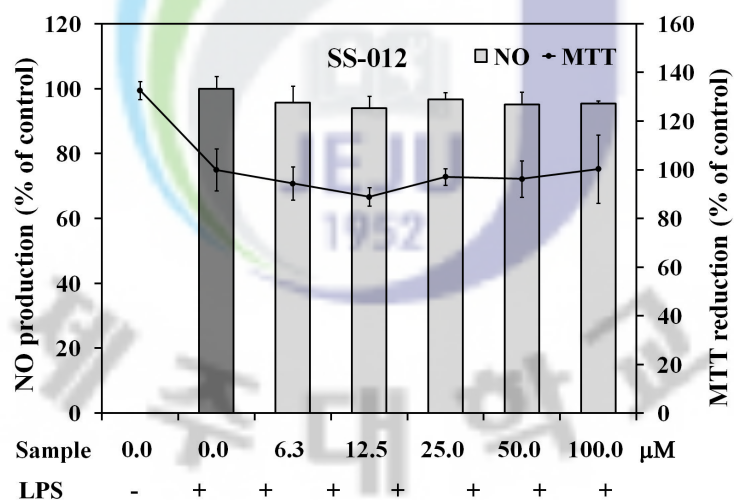


Fig. 2-47. Effect of SS-010 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 2-48. Effect of SS-011 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.



**Fig. 2-49. Effect of SS-012 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean $\pm$ S.D. of determination values.

## 4. 고 찰

제주조릿대는 제주도의 해발 600 m에서 1,900 m에 걸쳐 광범위하게 분포하고 있다. 최근에는 해발 600 m 이하 저지대의 일부 오름과 상록활엽수림에서 간헐적으로 분포하며 지속적인 확장을 통해 그 분포영역을 넓혀가고 있다(김현철, 2009). 제주조릿대의 확산은 한라산의 생태계를 위협하는 것으로 인식되고 있어 제주조릿대자원을 산업적으로 활용하기 위한 연구들이 요구되고 있다. 현재까지 제주조릿대로부터 유용한 생리활성을 갖는 화합물에 대한 연구는 극히 드물게 보고되고 있으며 대부분이 항산화 활성에 초점을 두어 수행되고 있다(Jiao et al., 2007; Lu et al., 2005; Sakai et al., 2008; Sultana and Lee, 2009, 2010). 본 연구에서는 제주조릿대 잎에서 유용한 화합물들을 분리 동정하여 이들의 항산화 및 항염 활성을 살펴보았다.

제주조릿대 잎으로부터 80% EtOH를 가하여 얻은 추출물을 이용하여 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 용매로 용매분획을 실시하였고, 크로마토그래피법을 이용하여 총 12종의 단일물질인 SS-001 ~ SS-012를 분리 및 동정하였다. 12종의 화합물 중 신규 화합물은 발견되지 않았지만, SS-003(methyl cis-p-hydroxycinnamate), SS-004(methyl trans-p-hydroxycinnamate), SS-005(2,3-dihydroxy-propyl 9Z, 12Z-octadecadienoate), SS-006((+)-(6S,7aS)-epilolide), SS-007 ((-)-(6R, 7aS)-Iololid) 등의 5개의 화합물은 조릿대에서 처음 보고된 화합물임을 확인할 수 있었다. 그리고 SS-003과 SS-004는 8번 위치의 탄소가 시스와 트랜스-형태의 서로 다른 이성질체인 것으로 확인되었다. SS-006과 SS-007 화합물도 10번 위치의 메틸 탄소가 삼차원적으로 서로 다른 관계를 갖는 이성질체로 확인되었다. 제주조릿대 잎에서 가장 많은 함량을 보이는 화합물은 SS-009 (3-O-p-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-O-β-glucopyranosylpropanol)이었다. 그리고 SS-010은 조릿대에서 많이 보고되어 지고 있는 tricinin에 배당체가 결합한 형태의 화합물로 밝혀졌다. 하지만 조릿대에서 보고된 tricinin과 tricinin 유형의 화합물은 분리되지 않았다(윤기동, 2000; Nakajima et al., 2003).

본 연구에서 분리된 12종의 화합물들은 flavonoids 2종, 불포화 지방산 1종,

lactone 계열의 화합물 2종, 페닐, 프로파놀, 페놀산이 결합된 형태의 화합물로 분류할 수 있다. 이들 화합물에 대한 DPPH 라디칼 소거능과 RAW 264.7 세포에서의 항염 활성을 비교한 결과, SS-009이 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다(100  $\mu$ M 농도에서 43.7% 수준의 라디칼 소거능). 그러나 SS-010 또한 100  $\mu$ M 농도에서 16.6% 수준의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 그리고 이는 Sultana and Lee(2009), Park 등(2007) 등이 보고한 결과와도 유사하였다.

제주조릿대에서 분리된 12개의 화합물들을 RAW 264.7 세포에 처리하여 이들의 세포독성을 관찰한 결과, 모든 화합물에서 세포독성은 나타나지 않았다. LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성에 대한 저해율은 12종의 분리된 화합물 중에서 불포화 지방산인 SS-005를 처리한 실험에서 가장 높게 나타났다( $IC_{50} = 41.8 \pm 1.6 \mu$ M). SS-003, SS-004, SS-009, SS-010 성분들 또한 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시키는 효과가 있었지만, 100  $\mu$ M 농도를 기준으로 비교한 결과, 측정된 NO 생성율은 각각 81.1%, 89.4%, 80.5%, 77.3%으로 다소 낮은 NO 생성 저해율을 보여  $IC_{50}$  값을 산출할 수 없었다. 그리고 그 외의 성분들은 NO 생성 저해활성이 관찰되지 않았다.

제주조릿대 잎은 항산화 효과, 항암, 항균, 항염 효과와 같은 다양한 활성을 나타내는 화합물을 함유하고 있는 유용한 천연자원으로 알려져 있다(박연옥과 임현숙, 2009; Ren et al., 2004). 또한 국내에서 식약청의 식품원료로 등재되어 있는 식물로(식약청, <http://www.kfda.go.kr>), 자원화가 이루어질 경우 높은 고부가가치를 창출할 수 있는 잠재력을 갖고 있는 식물이기도 하다. 따라서 제주조릿대의 산업적 활용을 위해서는 제주조릿대의 유효성분 분리와 이들의 생리활성에 대한 연구가 필수적이다. 본 연구를 통해 제주조릿대 잎에 함유된 12종의 화합물을 분리하였고, 이들의 생리활성을 관찰하였다. 그러나 본 연구에서 HPLC 크로마토그램 결과를 살펴보면, 분리된 12종 외에도 많은 성분들이 조릿대 분획물에 존재함을 확인할 수 있었다. 따라서 제주조릿대로부터 보다 많은 화합물의 분리·동정 연구와 더불어 NO 생성 저해활성을 보이는 화합물들의 상세한 항염 활성 기전을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다.



## Part II-3. 미역쇠 분리 카로테노이드류의 생리활성

### 1. 이론적 고찰

지구상에 존재하는 생물 중 해양 생물은 약 80%를 웃도는 것으로 알려져 있다(이현진, 1999). 그리고 해양 생물 중 20% 이상을 차지하는 해조류는 육상식물과는 다른 특이한 생합성 경로를 가지고 있어 새로운 생리활성 물질의 자원으로 이용할 수 있는 무한한 가능성을 가지고 있는 것으로 평가되고 있다(김진아, 2004). 해조류는 육상생물에 비해 단백질, 무기질, 비타민, 및 식이섬유 등의 영양소 함량이 높으며, 카로테노이드가 풍부하고 높은 항산화 효과를 나타내는 mycosporine-glycin이 많이 들어 있다고 알려져 있다(김은지 등, 2007; 배송자-B, 2004). 또한 해조류에 함유된 탄수화물은 혈관 내 콜레스테롤 침착을 방지하고 장관운동을 원활히 하며 중금속 배출을 촉진시킬 뿐만 아니라 고지혈증 개선에도 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(배송자-A, 2004; Takano et al., 1998). Yan 등(1998)은 중국 근해에 서식하는 27종 해조류 추출물들의 항산화 활성을 보고하였고, Matsukawa 등(1997)은 일본 근해에 서식하는 17종 해조류 추출물의 항산화 활성을 보고하였다. 우리나라에서도 김병목 등(2006)이 강원도 해안에 서식하는 7종 해조류 추출물의 항산화 활성을, 박재한 등(1991)은 식용 해조류 12종 추출물의 항산화활성과 항산화 물질을 분리하여 보고하는 등 해조류의 건강 증진효과에 관심이 고조되고 있다.

제주도 조간대에 다량 서식하는 미역쇠 (*Petalonia binghamiae* (J. Agardh) vinogradova)는 고리매목 (Scytosiphonales), 고리매과 (Scytosiphonaceae)에 속하는 식용 해조류로 한국, 일본, 중국 및 북아메리카 인도양, 태평양, 대서양 연안 등지에 분포하며 겨울에 조간대 바위에서 군락을 이루어 생육한다. 몸은 황갈색 또는 암갈색이며 짧은 뿔모양으로 가운데가 넓고 양끝으로 좁은 물결의 꾸불꾸불한 모양을 하고 있다. 반상근에서 1개 또는 여러 개가 뭉쳐서 자라고, 높이

100 ~ 250 mm, 폭 15 ~ 50 mm인 댓잎 모양의 가진 해조류이다(이용필, 2008, Yoshida, 1998).

식용 해조류인 미역쇠 추출물은 폴리페놀함량이 높으며 DPPH 라디칼 소거능이 높다고 알려져 있다(Kuda, 2006; Rhew and Boo, 1991; Xia and Abbott, 1987). 또한 미역쇠의 알콜 추출물은 STZ로 유도된 당뇨병 모델 마우스에서 혈당강화 효과와 내당능 개선효과를 보이며, 3T3-L1 세포(Mouse embryonic fibroblast - adipose like cell line)의 분화를 촉진시키고(Kang et al., 2008), 열수 추출물은 항비만 활성을 나타내는 것으로 보고하였다(Kang et al., 2010). Bano 등(1987)은 미역쇠로부터 hexadecanoic acid, 24-methylene cholesterol, D-mannitol을 분리하여 동정하였고, Araki 등(1991)은 지방분해 화합물인 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)을 보고하였다. Mori 등(2004)은 배양된 미역쇠로부터 fucoxanthin, apo-9'-fucoxanthinone, apo-13'-fucoxanthinone 등의 화합물을 분리하였고, Uddin 등(1990)은 24-methylene cholesterol, 24-methylcholesta-5,25-dien-3 $\beta$ -ol, 24-hydroxy, 24-vinyl cholesterol이 존재한다고 보고하였다. 특히, 미역쇠로부터 분리된, fucoxanthin과 galactosyldiacylglycerol은 포유류의 DNA polymerases의 증식을 억제시켜 항암, 항종양 효과를 보인다고 보고하였다(Mizushima et al., 2001; Murakami et al., 2002).

지금까지 제주도 연안 해조류에 관한 연구는 주로 조류학적인 차원에서의 분류학적인 연구가 대부분으로(부성민, 1988), 생리활성 물질에 대한 기능성 소재 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 미역쇠는 예로부터 제주에서 국이나 반찬으로 사용되어온 식용해조류이다. 최근 미역이나 다시마와 같은 양식 해조류의 산업화로 인하여 식용으로써의 활용가치가 많이 감소하였으나, 미역쇠의 다양한 생리활성에 대한 연구는 미역쇠가 식용뿐만 아니라 건강보조식품, 의약품, 기능성 향장품과 같은 원료로 활용이 가치가 크다는 것을 보여준다. 본 연구는 제주산 미역쇠로부터 주요 유효성분을 분리하고, 이에 대한 생리활성을 밝힘으로써 미역쇠를 유용자원으로 활용하기 위한 목적으로 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료 및 사용기기

#### 1) 재료

본 연구에 사용된 미역쇠는 2007년 4월 제주특별자치도 사계리 조간대에서 채취하였다(Fig. 3.1). 채취한 미역쇠는 흐르는 물로 수세하여 염분과 이물질을 제거한 후 동결 건조시켜 분쇄하였고, 이를  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하여 시료로 사용하였다.



Fig. 3.1. Photograph of *Petalonia binghamiae*.

#### 2) 시약

미역쇠 엽상체의 추출과 추출물로부터 화합물을 분리하기 위해 사용된 EtOH, MeOH은 Fisher Scientific Korea (Seoul, Korea)사의 HPLC 등급을 사용하였다. 또한 추출물의 전처리를 위해 사용한 역상 수지 Silica gel 100 (RP-18, 230-400

mesh)은 Merck사에서 구입하였다. 구조분석에 이용된 NMR 용매는 Merck사의 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였다.

### 3) Semi-prep LC

미역씨의 알콜추출물로부터 화합물을 분리하기 위한 장비는 Semi-prep LC (Waters사, 2695 Alliance system, USA)를 사용하여 분취하였다. 이 때 Semi-prep LC는 2개의 펌프, 컬럼 오븐, 자동시료주입기, 분획 수집기, PDA 검출기로 구성되어 있으며, 시료 루프의 용량은 100 µL이다.

### 4) NMR Spectroscopy

구조분석에 이용된 NMR 분광기는 500 MHz FT-NMR (Bruker사, AVENCE DRX-500 MHz system, Germany)을 이용하였고, 용매는 Merck사의 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였다.

## 2-2. 화합물의 분리

### 1) 시료의 추출 및 전처리

80% 에탄올 5 L에 건조된 미역씨 500 g을 넣고 상온에서 24시간 동안 2회에 걸쳐 반복 추출하였다. 에탄올추출액을 여과지를 사용하여 여과하였고, 여과액은 회전감압농축기(Buchi, R-200, Switzerland)를 사용하여 40°C에서 농축하였다. 농축된 추출물은 메탄올 100 mL를 가하고, 1500 rpm에서 4분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하였고, 이를 조릿대의 n-BuOH 분획물과 동일한 전처리 방법을 사용하여 분취하였다. 분취된 용매는 테프론 주사기 필터로 여과하고 Semi-prep LC를 사용하여 추출물의 성분을 분리하였다.

### 2) 화합물의 분리 및 동정

미역씨 분획물은 Semi-prep LC를 사용하여 분리하였다. 분취용 장비는 Semi-prep LC (Waters사, 2695 Alliance system, USA)를 사용하였고, 분취용 컬럼으로는 Symmetryprep<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 컬럼(7.8 × 300 mm ID, 7 µm)를 사용하였다. 이

때 컬럼 온도는 40℃를 유지하였다. 또한 PDA 검출기를 이용하여 200 nm ~ 600 nm 범위에서 성분을 검출하였다. 이동상은 MeOH과 초순수를 사용하였고, 기울기 용리법을 응용하여 분리를 수행하였다(Table 3-1). 화합물의 분취는 분획 수집기를 이용하여 머무름 시간이 동일한 분획물을 수집하여 농축하였다. 분리된 화합물은 NMR 전용용매를 사용하여 NMR 분광기로 동정하였다.

**Table 3-1. HPLC isolation condition of *P. binghamiae* extract.**

Time(min)	Flow(mL/min)	MeOH	Water
0.0	1.6	20	80
36.0	1.6	100	0
38.0	1.6	100	0
40.0	1.6	20	80
47.0	1.6	20	80

### 3-3. 생리활성 평가

#### 1) DPPH 자유 유리기 소거 활성

시료의 전자공여능 측정은 Blois 방법 (Blois, 1958)에 따라 DPPH(Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 앞에서 분리한 시료를 여러 농도로 메탄올에 희석시킨 용액 100 µL를 96 well plate에 분주하고, 여기에 0.4 mM DPPH 용액을 첨가하였다. 그리고 96 well plate를 차광상태에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 흡광도는 시료의 흡광도를 기준으로 표준화하였고, 대조군으로는 ascorbic acid와 BHA (Sigma, USA)를 사용하였으며 소거능은 다음의 식으로 산출하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 기준으로 IC<sub>50</sub>으로 표시하였고, 각 시료에 대해 3회 반복한 평균값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성 (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

$A_{\text{control}}$  = 메탄올 첨가 반응액 흡광도

$A_{\text{sample}}$  = 시료 첨가 반응액 흡광도

## 2) 대식세포의 배양

대식세포(Mouse RAW 264.7)는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았고, 이를 배양실험용 시료로 이용하였다. 대식세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

## 3) 세포 독성 측정

시료가 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT 분석법으로 미토콘드리아의 환원력을 측정하였다(Ferrari et al., 1990). DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에 RAW 264.7 세포를  $3 \times 10^4$  cells/well로 넣고 24시간 배양하였다. 그리고 여기에 여러 농도의 시료를 가하여 한 시간, 다시 LPS (Sigma, USA)를 100 ng/mL이 되도록 첨가한 후 22시간 동안 배양하였다. 다시 3-(4,5-dimethylthazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Amresco, USA)를 0.4 mg/mL이 되도록 넣고 한 시간 더 배양 후 배지를 제거하였다. 또 DMSO 200  $\mu$ L를 가하여 formazan 침전물을 용해시키고 microplate reader (Bio-tek, USA)로 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리한 군의 세포독성은 시료를 처리하지 않은 군과 흡광도 값을 비교하여 평가하였으며 세포독성은 다음의 식에 의해 산출하였다. 시료는 3-4회 반복 실험하였으며 아래 식에 의해 산출된 값의 평균으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$A_{\text{control}}$  = 추출물 미처리군

$A_{\text{Sample}}$  = 추출물 처리군

#### 4) NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에서 생성된 NO의 양은 Griess법을 이용하여  $\text{NO}_2^-$  형태로 측정하였다. Griess 분석은 세포배양액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess 시약 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 이때 Griess 시약은 1% (W/v) sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride/2.5% (v/v) phosphoric acid 용액을 혼합하여 조제하였다. 그리고  $\text{NO}_2^-$  정량분석은 아질산나트륨 표준용액을 사용하여 표준검정곡선을 작성한 후 이를 이용하여 생성된 NO 값을 산출하였다.

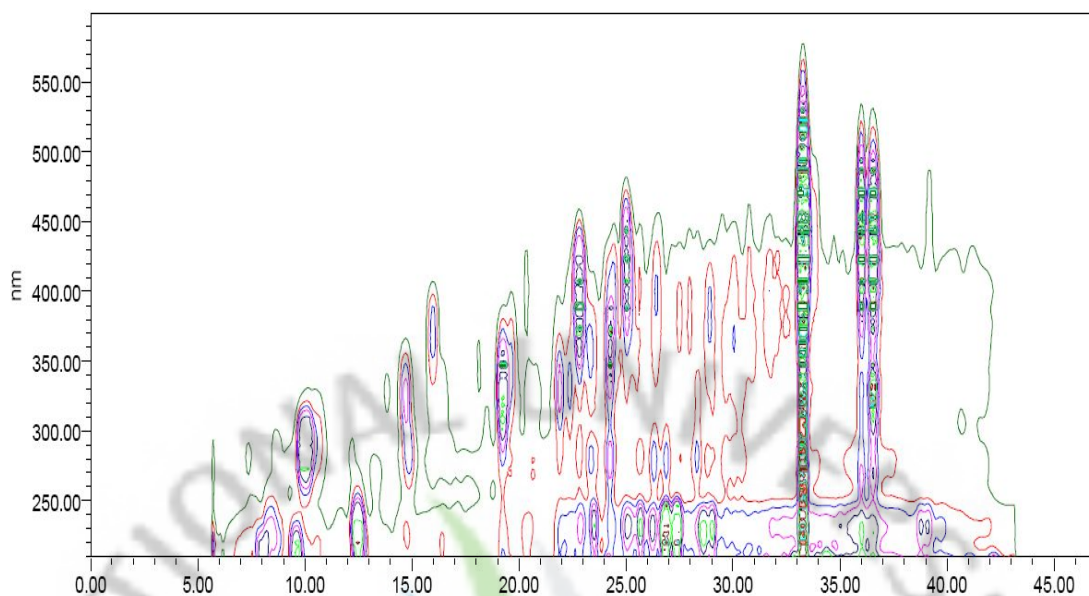


### 3. 결 과

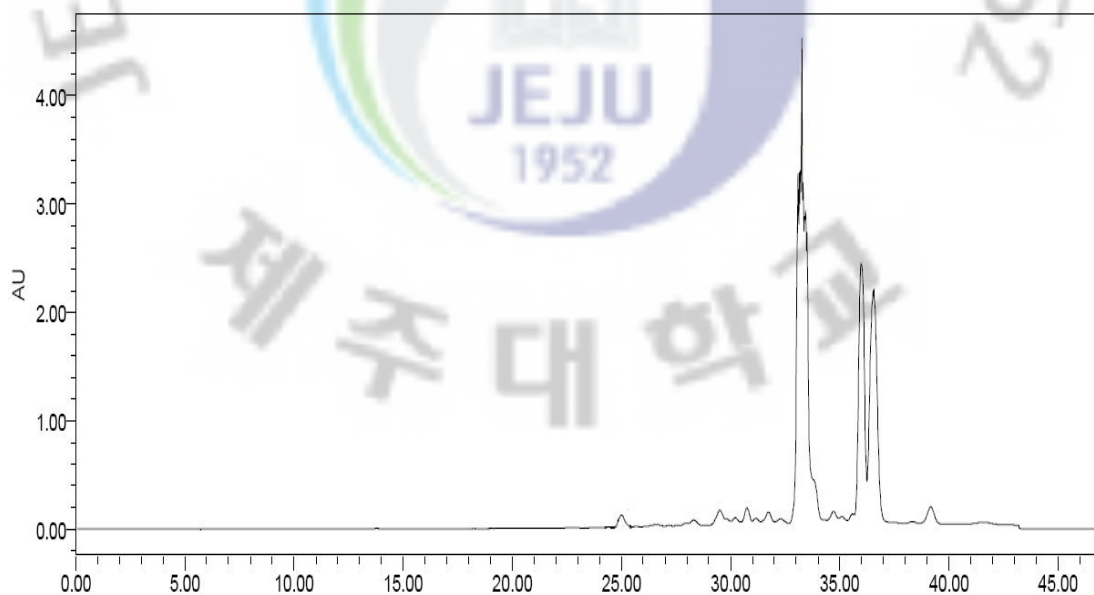
#### 3-1. 화합물의 분리 및 구조결정

미역쇠 500 g을 80% 에탄올로 추출하여 56.7 g의 에탄올 추출물을 얻었고, 추출물로부터 미역쇠에 존재하는 화합물을 분리하기 위해 제주조릿대에서 사용한 n-BuOH 분획물의 전처리방법과 동일한 주사기 컬럼 시스템 방법을 사용하였다. 분취된 분획물을 PDA 검출기로 구성된 Semi-prep LC system을 사용하여 화합물에 대한 정보를 확인하였다. 그 결과 미역쇠 추출물은 한 개의 화합물을 다량 함유하고 있는 조성을 갖는 것을 확인하였고(Fig. 3-2, 3-3), 33분 ~ 33.6분, 36.3 ~ 36.9분 사이에 머무름 시간을 갖는 compound 1과 2의 화합물을 분취하여 각각 PB-001과 PB-002로 명명하였다. 분리된 두 화합물은 CD<sub>3</sub>OD로 푼 후 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)과 <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz)을 측정하였다(Fig. 3-4 ~ 3-8, Table 3-2). 미역쇠로부터 분리한 두 화합물의 UV 흡광도 값은 450 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 이를 문헌치의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 데이터와 비교한 결과 PB-001은 fucoxanthin과 동일한 구조를 갖는 화합물인 것으로 동정되었고, PB-002는 8' 위치가 cis인 fucoxanthin의 이성질체로 확인되었다(Englert et al., 1990; Haugan and Liaaen-Jensen, 1994).





**Fig. 3-2. 2D-contour plot of MeOH extracts obtained by PDA detector system.**



**Fig. 3-3. HPLC chromatogram of MeOH extracts (at 280 nm detection wavelength).**

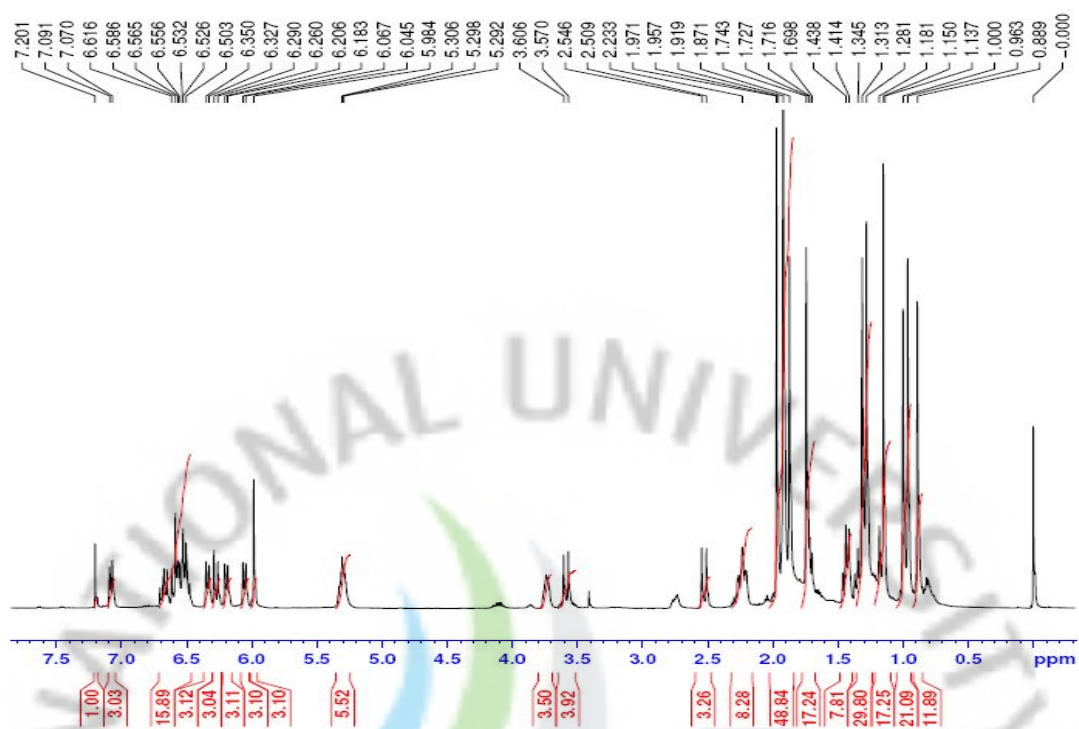


Fig. 3-4.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of PB-001 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz for  $^1\text{H}$ ).

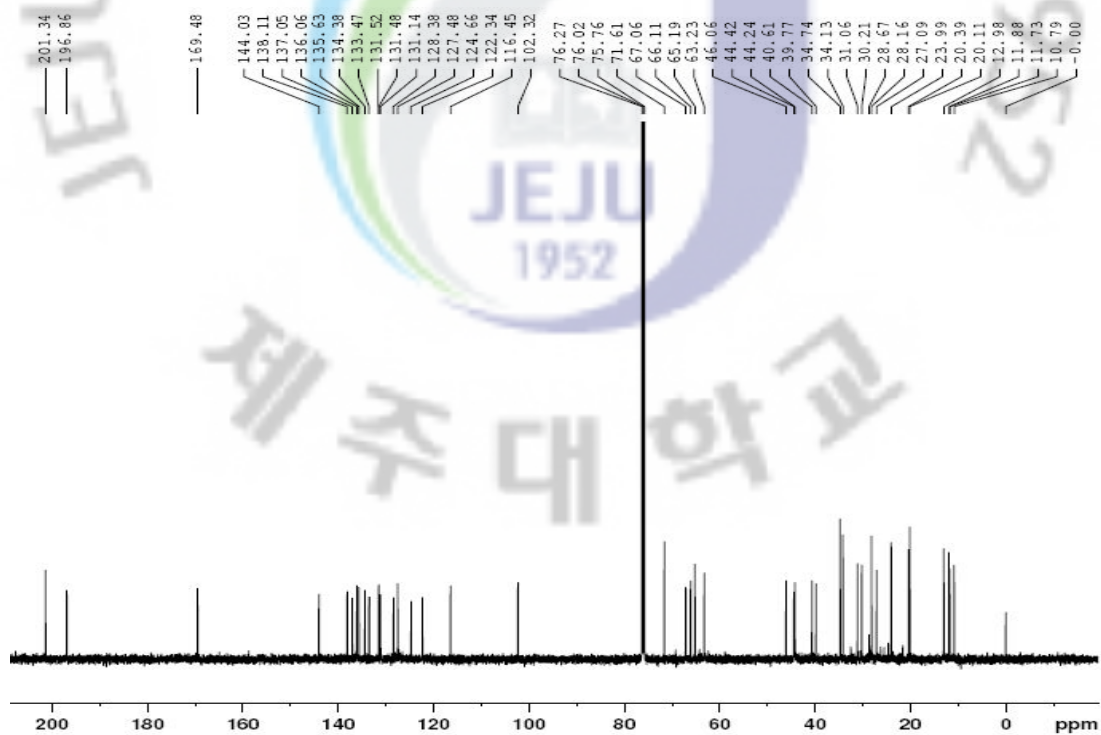


Fig. 3-5.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of PB-001 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

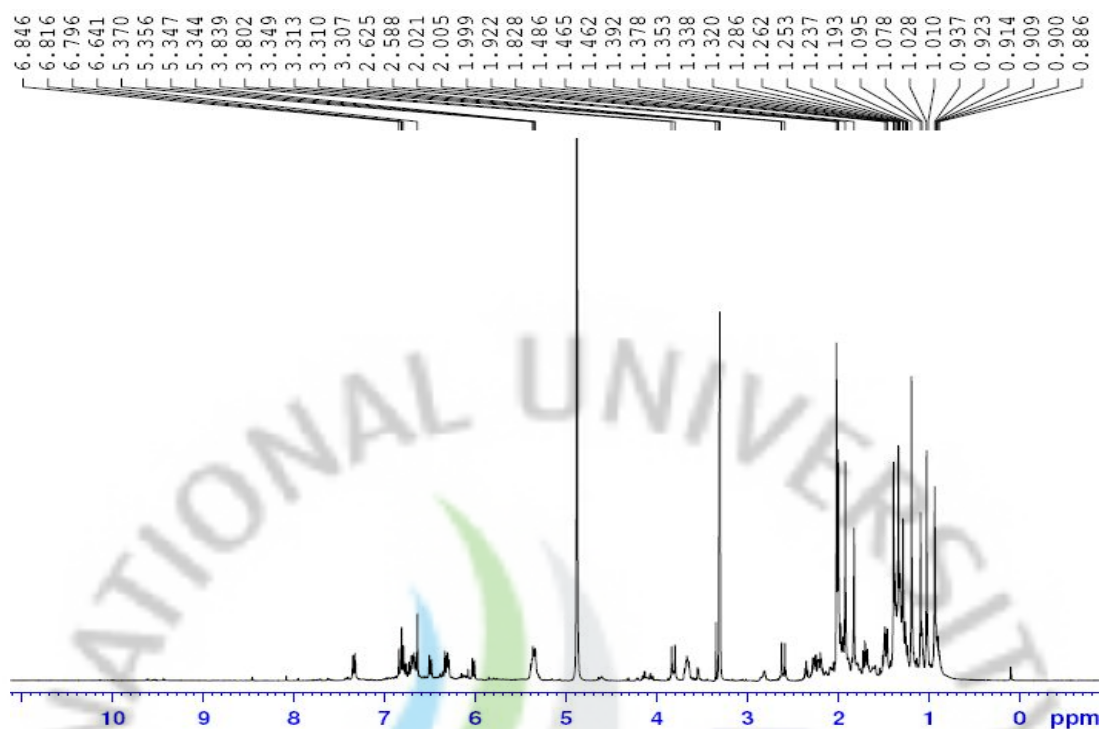


Fig. 3-6.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of PB-002 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz for  $^1\text{H}$ ).

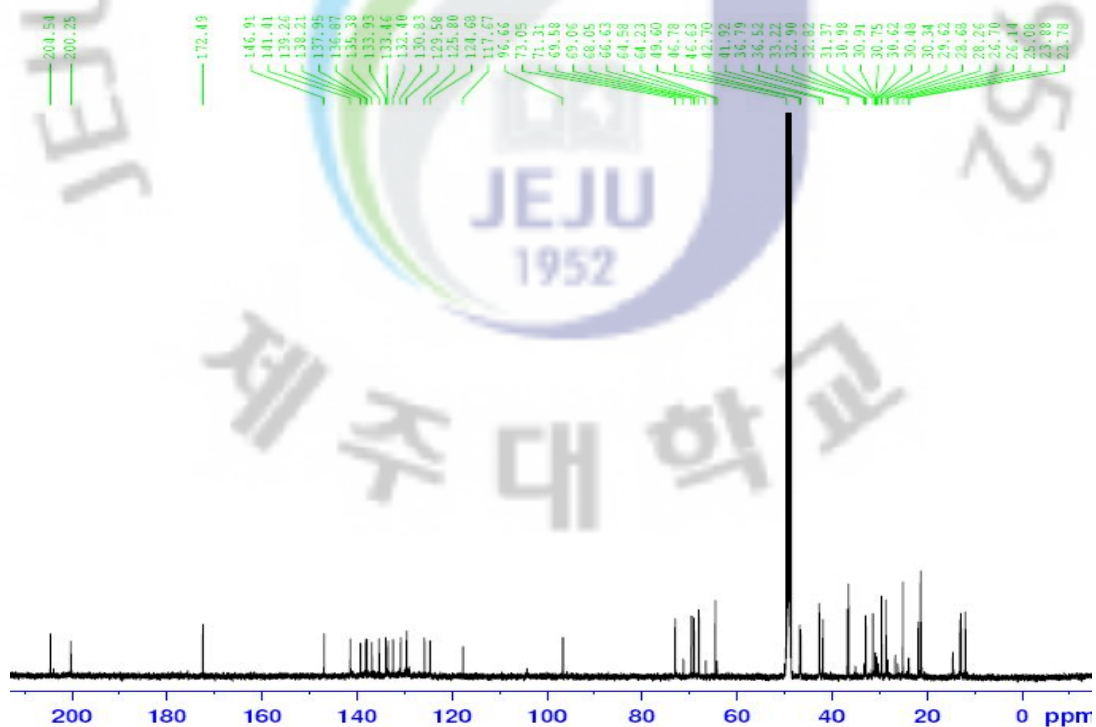


Fig. 3-7.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of PB-002 in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (125 MHz for  $^{13}\text{C}$ ).

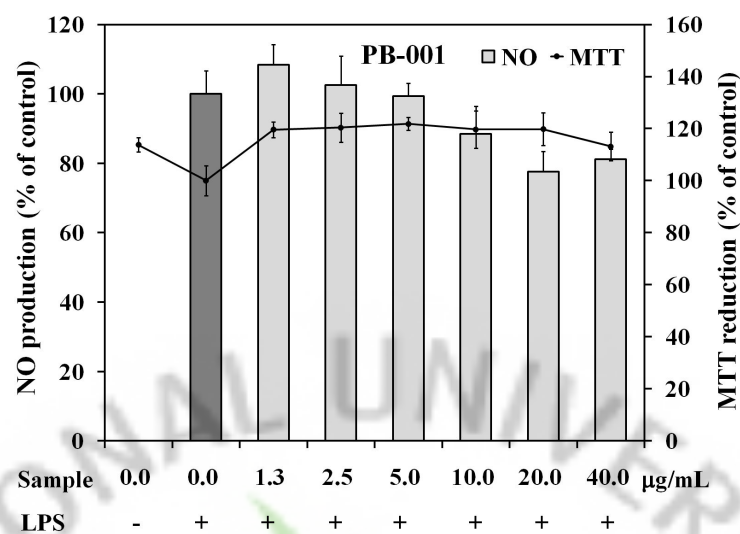


### 3-2. DPPH 라디칼 소거 활성

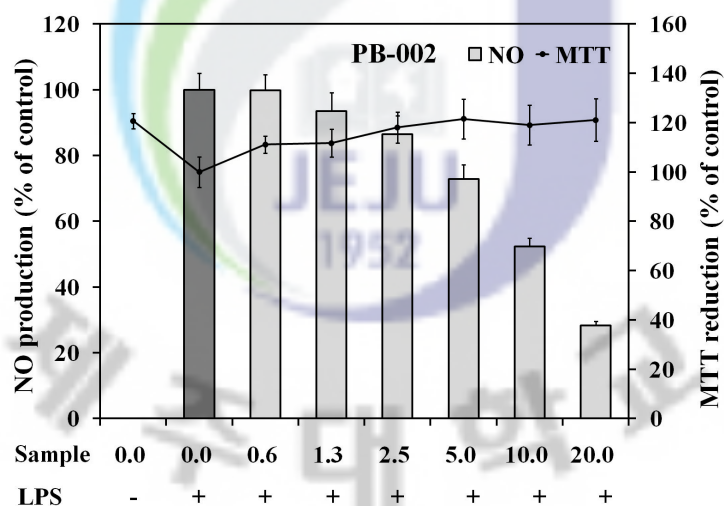
미역쇠로부터 분리된 PB-001과 PB-002의 DPPH radical 소거 활성을 측정 한 결과 DPPH radical 소거 활성은 관찰되지 않았다(data not shown).

### 3-3. NO 생성 저해 활성

미역쇠로부터 분리된 PB-001과 PB-002의 NO 생성 저해 활성 살펴보기 위해, RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하고 생성된 NO의 저해율을 확인하였다. 또한 투여된 화합물의 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu$ M 농도 범위에서 MTT assay를 실시하였고, 그 결과 세포독성은 나타나지 않았다. LPS로부터 자극된 RAW 264.7세포에서 PB-001과 PB-002 모두 농도의존적으로 NO 생성을 감소시켰지만(Fig. 3-9, 3-10). PB-002( $IC_{50} = 10.6 \pm 0.6$ )가 PB-001보다 더 높은 NO 생성 저해활성을 나타내었다.



**Fig. 3-9.** Effect of PB-001 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean±S.D. of determination values.



**Fig. 3-10.** Effect of PB-002 on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were incubated with the indicated concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µM) of PMF 7 for 1 h, and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The data represent the mean±S.D. of determination values.

#### 4. 고 찰

미역쇠는 우리나라를 비롯한 중국, 일본에서 전통적으로 식용되어온 해조류로, 최근 보고된 연구에 의하면 항당뇨, 항비만 및 항산화 활성을 갖는다고 보고되었다(Kang et al., 2008; Kang et al., 2010; Kuda et al., 2006). 하지만 미역쇠의 주요성분에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 그 중 일부 화합물만이 보고되고 있다.

본 연구에서는 미역쇠로부터 유효성분을 분리하기 위하여 Semi-prep LC를 사용하여 200 nm ~ 600 nm 파장 범위에서 미역쇠 에탄올 추출물의 성분을 검색하였다. 일반적으로 대부분의 알콜 추출물에 함유된 화합물들은 HPLC를 통하여 분리된 HPLC 크로마토그램에서 비슷한 수준의 흡광도를 보이거나, 흡광도 차이를 보인다 하더라도 하나의 성분만이 뚜렷하게 나타나는 경우는 매우 드물다(Sanchez-Machado et al., 2004; Yumiko et al., 2003). 하지만 미역쇠 에탄올 추출물인 경우, Fig. 3-2와 3-3과 같이 하나의 화합물 성분에 대한 흡광도가 매우 높게 나타나는 특징을 보였다. 따라서 본 연구에서는 미역쇠 에탄올 추출물을 역상 크로마토그램 시스템을 구성한 주사기 컬럼을 사용하여 정제한 후, Semi-prep LC를 사용하여 가장 큰 흡광도를 보이는 PB-001과 이와 유사한 흡광도를 보이는 PB-002를 동일한 조건에서 분리하였다. 미역쇠에서 분리된 두 화합물은  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 매우 복잡한 형태의 피크가 관찰되어, 이들 성분의 구조 동정에 앞서 문헌 조사를 먼저 실시하였다(Katoh and Ehara, 1990; Mori et al., 2004; Murakami et al., 2002). 그 결과 450nm에서 최대 흡광도를 갖는 PB-001은 미역쇠로부터 이미 분리되었다고 보고된 fucoxanthin으로 확인되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼을 살펴보면(Table 3-2), 두 화합물의  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 데이터는 모두 동일한 탄소 피크를 보였지만, 8' 탄소와 19' 탄소 위치에서 PB-001은 각각 103.4 ppm, 14.0 ppm의 피크를 보이는 것으로 보아, 트랜스 구조의 화합물임을 예측할 수 있었고, PB-002는 96.5 ppm, 21.3 ppm의 피크가 관찰되는 것으로 보아 시스 형태의 fucoxanthin 이성질체임을 예측할 수 있었다. 따라서, PB-002 데이터를 선행연구와 비교해본 결과 fucoxanthin으로부터 합성하여 만들

어진 이성질체와 동일한 화합물로 확인되었다. 하지만 PB-002는 식물에서는 지금까지 보고되지 않은 신규 화합물로 확인되었다(Englert et al., 1990; Haugan and Liaaen-Jensen, 1994).

PB-001과 PB-002에 대한 DPPH radical 소거 활성을 관찰한 결과 두 화합물에 대한 항산화 효과는 관찰되지 않았지만, LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 저해하는 항염활성이 관찰되었다. PB-001과 PB-002는 서로 화학구조가 유사한 이성질체지만 NO 생성 저해 활성은 PB-002가 매우 우수한 것으로 나타난 결과는 흥미롭다. 따라서 PB-001과 PB-002의 항염작용 기전에 대한 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

최근 해조류에서 분리된 fucoxanthin에 대한 다양한 생리활성들이 보고되고 있다. Fucoxanthin의 주요 생리활성은 항산화 활성(Yan et al., 1999)과 백색지방 조직(white adipose tissues)에서 UCP1 발현을 통한 항비만 효과(Maeda, 2005), 악성종양세포(human malignant tumor cells)에서 세포주기의 진행과 N-myc 발현을 억제하는 항암활성(Okuzumi et al., 1990) 등이 보고되어 있다.

이러한 활성 외에도 미역쇠 추출물의 다양한 건강 증진 효과들(Kang et al., 2008; Kang et al., 2009; Kuda et al., 2006)이 알려지면서 미역쇠의 새로운 식의약품 소재 개발에 대한 기대와 가능성은 지속적으로 증대되고 있다. 이를 위해서는 미역쇠로부터 많은 유효성분들을 분리하고 이들의 건강증진 효과를 분자수준에서 규명하는 체계적인 연구들이 필요하다고 사료된다.



### Ⅲ. 연구 요약

천연물에서 분리된 플라보노이드, 카로테노이드, 폴리페놀 화합물과 같은 유효 성분은 다양한 생리활성을 나타내고, 기능성 및 천연 의약품소재로 활용되고 있다. 본 연구에서는 제주에서 자생하는 식물 중 진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka), 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai), 미역쇠(*Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova)로부터 다양한 유효성분을 분리하였다. 그리고 DPPH 라디칼 분석법과 대식세포 NO 생성 저해실험을 통하여 이들의 항산화 활성과 항염 활성을 확인하였다.

제주 재래굴인 진귤의 성숙과피를 열수 추출하고 추출액을 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH로 용매분획하였다. 그리고 sinensetin, nobiletin, tangeretin 표준 물질을 사용하여 이들 분획물에 함유된 PMFs 함량을 확인하였다. 그 결과 n-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 분획물은 각각 75.8, 58.0, 6.5, 2.1%의 PMFs 함량을 나타내었다. 또한 PRF(n-hexane 분획물)에서 5,7,4'-trimethoxyflavone, Tetra-O-methylisotellarein, Sinensetin, Nobiletin, Tangeretin, Isosinensetin, 5-Demethylnobiletin, 5-Demethyltangeretin와 같이 6개 PMFs와 2개 demethylated PMFs를 분리하였다. 이때 분리된 8개의 PMFs의 분취 효율을 PRF의 함량분석 결과와 비교해 본 결과, PRF는 대략 85% 정도의 PMFs 조성물로 추정되었다. LPS를 처리하여 NO를 생성시킨 RAW 264.7 대식세포에서 PRF와 분리된 PMFs에 대한 NO 생성 저해율을 관찰한 결과, PRF 조성물은 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰고, 50 µg/mL의 농도에서 92.5% 수준의 NO 생성 저해활성을 나타내었다. 분리된 PMFs의 NO 생성 저해능은 Tetra-O-methylisotellarein를 제외한 모든 PMFs에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰으며, 특히 5,7,4'-trimethoxyflavone은 가장 우수한 NO 생성 저해활성을 나타내었고, 100 µM 농도 처리시 97.6% NO 생성 저해능을 보였다.

제주조릿대로부터 12종의 화합물을 분리하였고, 이 중 3-O-p-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-O-β-glucopyranosylpropanol는 제주조릿대의 주

요 성분으로 확인되었고, methyl cis-p-hydroxycinnamate, methyl trans-p-hydroxycinnamate, 2,3-dihydroxypropyl 9Z, 12Z-octadecadienoate, (+)-(6S, 7aS)-epilolide, (-)-(6R, 7aS)-Ioliolide은 조릿대에서 새롭게 확인된 화합물이었다. 그리고 각 화합물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성과 NO 생성 저해활성을 확인한 결과, 3-O-*p*-coumaroyl-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-O-β-glucopyranosyl propanol와 triclin 7-O-β-D-glucopyranoside은 각각 43.7, 16.6%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 2,3-dihydroxypropyl 9Z, 12Z-octadecadienoate는 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에 100 μM 농도 처리시 NO 생성이 관찰되지 않는 아주 우수한 항염 활성을 나타내었다.

미역쇠로부터 카로테노이드의 일종인 trans-fucoanthin과 cis-fucoanthin 2종의 이성질체를 분리할 수 있었다. 이 중 trans-fucoanthin은 미역쇠의 주요 성분으로 확인되었고, cis-fucoanthin은 이전에 식물에서 보고된 바 없는 신규화합물이었다. 대식세포(RAW 264.7 세포)에서 NO 생성 저해활성을 확인한 결과, cis-fucoanthin은 71.7%(IC<sub>50</sub> = 10.6 ± 0.6)의 우수한 NO 생성 저해활성을 나타내었다.

이와 같은 연구를 통하여 제주도 주요 자생식물로부터 기능성 화학성분을 분리하였고, 그 화합물의 화학 구조를 규명하였다. 또한 각 성분의 DPPH 라디칼 소거활성과 대식세포내 NO 생성 저해활성을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 앞으로 제주도 자생식물을 원료로 천연물 식·의약품 소재를 개발하는데 필요한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 참고 문헌

- 강신해, 이영재, 이창홍, 김세재, 이대호, 이영기, 박덕배. (2005) 제주자생 진귤 (*Citrus sunki* Hort. Tanaka) 과피의 생리활성. *Koeran J. Food Sci. Technol.*, 37(6), 983-988.
- 고명수. (2008) 조릿대 줄기와 잎의 화학성분과 그 추출물의 항산화 및 항균활성. *Korean J. Food Preserv.* 15(1), 125-132.
- 김나리. (2007) 한련초에서 분리한 수용성 분획의 항염 활성에 관한 연구. 인하대학교 대학원 석사학위논문, 1-5.
- 김동명. (2006) 일본 바이오클러스터 소개와 건강기능성 식품의 현황 및 전망. 한국보건산업진흥원, 보건산업기술동향, 150-157.
- 김병목, 전준영, 박영범, 정인화 (2006) 해조류 메탄올 추출물의 항산화 효과. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35(8), 1097-1101.
- 김세재 (2007) 제주 재래감귤류의 산업적 활용 실증 연구. 제주하이테크산업진흥원, 2-27.
- 김용덕, 마힌다, 고경수, 전유진, 김수현 (2009) 수확시기별 제주재래종 감귤과피의 활성산소종 소거활성. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38(4), 462-469.
- 김은지, 박소영, 홍지은, 신민정, 임순성, 신현경, 윤정한. (2007) 보라우무 메탄올 추출물의 HT-29 대장암세포 증식 억제 효과. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36(4), 431-438.

- 김진아. (2004) 해조류의 채집시기·조리·가공방법에 따른 주요성분 및 생리활성 변화와 활성물질의 분리동정. 이화여자대학교 대학원, 박사학위논문, 1-17.
- 김창민, 한대석, 허인욱 (1979) 제주도 채래감굴의 식물학적 특성과 이용에 관한 연구. *생약학회지*, 10(2), 85-87.
- 김창진, 강병화, 유진자, 박동진, 이현선, 김영호, 유익동 (1996) 다양한 잡초로부터 생리활성물질의 탐색. *한국농화학회지*, 39(5), 409-413.
- 김창호. (1996) 생육지 환경 구배에 따른 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)의 생태형적 변이. *J. of Nat. Sci. of Pusan Women's Univ.*, 2, 21-36.
- 김현철. (2009) 제주조릿대의 생태학적 특성 및 관리방안. 제주대학교 대학원 박사학위논문, 86-91.
- 문병찬, 정철환 (2005) 제주도 청수공 시추코아에서 산출된 플라이스토세 포자·화분화석의 화분층서 및 고기후적 의미, *Jour. Korean Earth Science Society*, 26(3), 276-282.
- 박기의, 김유아, 정현아, 이희정, 아중웅, 이범중, 서영완. (2004) 갈조류 지층이로부터 분리한 3개의 Norisoprenoids 화합물. *Journal of the korean chemical Society*, 48(4), 394-398.
- 박연옥, 임현숙 (2009) 추출용매에 따른 조릿대 잎 추출물의 항산화활성. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38(12), 1640-1648.
- 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순. (1991) 식용해조류에서 항산화 물질의 분리. *한국식품과학회지*, 23(3), 256.

- 배송자-A (2004) 모자반 분획물의 *in vitro*에서의 항발암효과. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33(3), 480-486.
- 배송자-B (2004) 서실의 항산화, 항균효과 연구. *Journal of Life Science*. 14(3), 411-416.
- 부성민 (1988) 제주해역 海藻類의 分布論的 考察, *제주도연구*, 5, 97-114.
- 신혜선 (2010) RAW 264.7 세포에서 산귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) 과피 추출물과 sinensetin의 항염증 작용. 제주대학교 대학원, 석사학위논문, 7-9.
- 오진보, 문두길, 한해룡, 김한용 (1996) RAPD를 이용한 제주재래 감귤의 DNA다형 분석, *한국원예학회*, 14(1), 184-185.
- 윤기동, 김철영, 허훈. (2000) 조릿대잎의 flavone 배당체 성분. *생약학회지*, 31(2), 224-227.
- 이용필. (2008) 제주의 바닷말. 아카데미 서적, 121.
- 이현진, 김진희, 이주현, 김종식, 광상태, 이정복, 송격식, 최병욱, 이봉호. (1999) 해조류 메탄올 추출물의 prolyl endopeptidase, tyrosianse 저해 및 항응고 활성 스크리닝. *한국 생약학회지*, 30(3), 231.
- 장현주 (2007) 제주도 자생 식물들의 항산화 활성 검색. 제주대학교 대학원 석사학위논문, 1-10.
- 전용필, Mollah, M.H., 박창호, 홍주현, 이기동, 송재찬, 김길수. (2009) RAW 264.7세포에서 lipopolysacchride로 유발시킨 염증반응에 대한 *Bulnesia sarmienti* 열수추출물의 억제 효과. *Journal of Life Science*, 19(4), 479-458.

- 정창호, 최성길, 허호진. (2008) 조릿대 잎차의 영양성분 및 기능성 평가. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40(5), 586-592.
- 정태영 (1994) 진달래꽃으로부터 분리된 polyphenolic compound에 관한 연구. 부산대학교 대학원, 12-37.
- 제주하이테크산업진흥원 (2003) 제주생물산업기술발전 10개년 계획, 제주도, 제 1권, 11-30. 86-91.
- 최윤희. (2007) 바이오산업의 2020 비전과 전략. 산업연구원, 정책자료, 2007-55.
- 현재석, 강성명, 마힌다, 고원준, 양태석, 오명철, 오창경, 전유진, 김수현 (2010) 진굴 및 온주밀감 진피의 항산화 활성. *한국식품영양과학회지*, 39(1), 1-7.
- Abe, S., Fan, K., Ho, C.T., Ghai, G., Yang, K. (2007) Chemopreventive Effects of Orange Peel Extract (OPE) II. OPE inhibits atypical hyperplastic lesions in rodent mammary Gland. *J. Med. Food.* 10(1), 18-24.
- Abul, K., Abbas, A.K. (2006) Cellular and molecular immunology. 6th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, 75-97.
- Akoh, C.C. (2006) Handbook of functional lipids. *Taylor & Francis*, 123-124.
- Akowuah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., Sadikun, A., khamsah, S.M. (2004) Sinensetin, euptorin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of Orthosiphon stamineus from Malaysia. *Food Chemistry*, 87(4), 559-566.
- Alamdari, D.H., Ghayour-Mobarhan, M., Tavallaie, S., Parizadeh, M.R.,

- Moohegati, M., Ghafoori, F., Kazemi-Bajestani, S.M.R., Paletas, K., Pegiou, t., Koliakos, G. (2008) Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*, 41(6), 375-380.
- Al-Dabbas, M.M., Al-Ismail, K., Kitahara, K., Chishaki, N., Hashinaga, F., Suganuma, T., Tadera, K. (2007) The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of Varthemia crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 104(2), 734-739.
- Amazad Hossain, M., Salehuddin, S.M., Kabir, M.J., Rahman, S.M.M., Vasantha Rupasinghe, H.P. (2009), Sinensetin, rutin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetra methoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. *Food Chemistry*, 113(1), 185-190.
- An, S.M., Lee, S.I., Choi, S.W., Moon, S.W., Boo, Y.C. (2008) p-coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by  $\alpha$ -melanocyte stimulin hormone. *British Journal of Dermatology*, 159(2), 292-299.
- Anagnostopoulou, M.A., kefalas, P., Kokkalou, E., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. (2005) Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 19(2), 138-148.
- Araki, S., Eichenberter, W., Sakurai, T., Sato, N., Nori, Y. (1991) Distribution of diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- $\beta$ -alanine (DGTA) and phosphatidyl choline in brown algae. *Plant Cell Physiol.*, 1991, 32(5), 623-628.

- Axtelle, T., Pribble, J. (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin Res.*, 7(4), 310-314.
- Ayer, W.A., Trifonow, L. (1995) Phenolic and polyketide metabolites of the aspen blue stain fungus *Ophiostoma crassivaginata*. *Phytochemistry*, 38(2), 371-372.
- Bano, S., Perveen, S., Ahmad, V.U., Bano, S.N., Shameel, M. (1987) Chemical constituents of *Endarachne binghamiae* (Scytosiphonales, Phaeophyta) from the Karachi coast. *Botanica Marina*, 30(5), 371-372.
- Bergmann, F., Yagen, B. (1989) Structure-activity relationships for the direct toxic action of trichothecenes on rat brain. *Arch. Toxicol.*, 63(2), 155-156.
- Blois M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1998) Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 46(6), 2123-2129.
- Bohm, F., Edge, R., Burke, M., Truscott, T.G. (2001) Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide-ROS components from cigarette smoke. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 64(2-3), 176-178.
- Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A., Callea, A. (2010) Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of



isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food. Chem.*, 118(2), 256-265.

Bosca, L., Zeini, M., Traves, P.G., Hortelano, S. (2005) Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208(2), 249-258.

Branen, A.L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52(2), 59-63.

Brown, J.A. (1980) A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat. Res.*, 75(3), 243-277.

Campbell, J.J.N. (1985) Bamboo flowering patterns: a global view with special reference to East Asia. *Journal of American Bamboo Society*, 6(1-4), 17-35.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760.

Chandrasekar, D., Madhusudhana, K., Ramakrishna, S., Diwan, P.V. (2006) Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 40(2), 460-464.

Chen, J., Montanari, A.M. (1998) Isolation and identification of new polymethoxyflavonoids from dancy tangerine leaves. *J Agric. Food Chem.*, 46(4), 1235-1238.

- Chen, K.H., Weng, M.S., Lin J.K. (2007) Tangeretin suppresses II-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase(COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 73(2), 215-227.
- Choe, S.Y., Yang, K.H. (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene(BHT) and butylated hydroxy anisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 283.
- Choi, S.Y., Ko, H.C., Ko, S.Y., Hwang, J.H., Park, J.G., Kang, S.H., Han, S.H., Yun, S.H., Kim, S.J. (2007) Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(4), 772-778.
- Choi, S.Y., Lee, K.C., Jeoung, Y.J., Lim, B.O., (2007) In-vitro anti-inflammatory activity of rubus coreanus Miq. on nitric oxide, interferon-gamma, cyclooxygenase-2, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in the macrophage like cell line raw 264.7 activated by lipopolysaccharide. *Korean Journal of Medicinal Crop. Science.* 15(5), 324-329.
- Choi, Y.J., Lim, H.S., Choi, J. S., Shin, S. Y., Bae, J. Y., Kang, S. W., Kang, I. J., Kang, Y. H. (2008). Blockade of chronic high glucose-induced endothelial apoptosis by Sasa borealis Bamboo extract. *Exp. Biol. Med.*, 233(5), 580-591.
- Chung, W., Coo, Y.M., Na, D.S., Kim, K.J. (1995) A phospholipase A2 inhibitor from *Arisaema amurense* Max. var. *serratum* Nakai. *Arch. Pharm. Res.*, 18(4), 293-294

- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107(4), 526-545.
- Cui, Z.G., Kim, B.Y., Kang, S.H., Lee, Y.J., Lee, D.H., Lee, Y.K., Park, D.B. (2007) Fermented peel of citrus sunki Hort. ex Tanaka promotes ethanol methbolism and suppresses body fat accumulation. *Food Sci. Biotech.*, 16(2), 311-314.
- Da Rocha, A.B., Lopes, R.M., Schwartzmann, G. (2001) Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4), 364-369.
- Dandan, W., Jian, W., Xuehui, H., Ying, T., Kunyi, N. (2007) Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel(Pericarpium Citri Reticulatae Viride) by chromatographic and spectroscopic techniques. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 44(1), 63-69.
- Defeng, W. Cederbaum, I. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 24(4), 277-284.
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12(7), 1193-1196.
- Dvorak, Z., Vrzal, R., Maurel, P., Ulrichova, J. (2006) Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF- $\kappa$ B in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions*, 159(2), 117-128.

- Elangovan, V., Sekar, N., Govindasamy, S. (1994) Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene induced tumorigenesis. *Cancer Lett.* 87(1), 107-113.
- El-Shafae, A.M. (2002) Bioactive polymethoxyflavones and flavanone glycosides from the peels of *Citrus deliciosa*. *Honghua yao xue za zhi*, 54(3), 199-206.
- Endo, T., Fukunaga, T., Yoshimura, T., Esumi, K. (2006) Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. *J. Colloid. Interface. Sci.*, 302(2), 516-521.
- Englert, G., Bjornland, T., Liaaen-Jensen, S. (1990) 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 28(6), 519-528.
- Fan, K., Kurihara, N., Abe, S., Ho, C.T., Ghai, G., Yang, K. (2007) Chemopreventive effects of Orange Peel Extract (OPE) I. OPE inhibits intestinal tumor growth in  $Apc^{Min/+}$  Mice. *J. Med. Food.* 10(1), 11-17.
- Ferrari, M., Fornasiero, M.C., Isetta, A.M. (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*, 131(2), 165-172.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376.
- Green, C. O., Wheatley, A. O., Osagie, A. U., St, A. Morrison EY., Asemota, H. N. (2007). Determination of polymethoxylated flavones in peels of

selected Jamaican and Mexican citrus (*Citrus* spp.) cultivars by high-performance liquid chromatography. *Biomedical chromatography*, 21(1), 48-54.

Han, A.R., Jang, D.S., Park, G., Jhon, G.J., Seo, E.K. (2004) Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. *Arch. Pharm. Res.*, 27(4), 386-389.

Hasegawa, H., Tanaka, A., Hosoda, A., Takano, F., Ohta, T. (2008) Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry*, 69(6), 1419-1424.

Haugan, J.A., Liaaen-Jensen, S. (1994) Isolation and Characterisation of four allenic (6'S)-isomers of Fucoxanthin. *Tetrahedron Letters*, 35(14), 2245-2248.

He, Q., Riley, R.T., Sharma, R.P. (2002) Pharmacological antagonism of fumonisin B1 cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK1): a model for reducing fumonisin-induced nephrotoxicity in vivo, *Pharmacol. Toxicol.* 90(5), 268-277.

Hirano, T., Abe, K., Gotoh, M., Oka, K. (1995) Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br. J. Cancer*, 72(6), 1380-1388.

Hirata, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M., Hongo, D. (2009) Identification and physiological evaluation of the components from citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(1), 25-28.

- Huang, Y.T., Wang, G.F., Chen, C.F., Chen, C.C., Hong, C.Y., Yang, M.C. (1995) Fructus auratii reduced portal pressure in portal hypertensive rats. *Life sci.*, 57(22), 2011-2020.
- Iwase, Y., Takhashi, M., Takemura, Y., Ju-ichi, M., Ito, C., Furukawa, H., Yano, M. (2001) Isolation and identification of two new flavanones and a chalcone from *Citrus kinokuni*. *Chem. Pharm. Bull.*, 49(10), 1356-1358.
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Sikder, S., Rao, L.J., Sakaliah, K.K. (2000) Antibacterial activity of Citrus reticulate peel extracts. *Z. Naturforsch C.*, 55(11-12), 1030-1034.
- Jeong Y.H., Chung, S.Y., han, A.R., Sung, M.K., Jang, D.S., Lee, J., Kwon, Y., Lee, H.J., Seo, E.K. (2007) P-Glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds, (-)-syringaresinol and triclin from *Sasa borealis*. *Chemistry & Biodiversity*, 4(1), 12-16.
- Jeong Y.H., Nam, J.W., Lee, N.Y., Seo, E.K., Kwon, Y. (2005) Isolation and structural identification of minor constituents from *Sasa borealis*. *Natural Product Sciences*. 11(3), 170-173.
- Jiao, J., Zhang, Y., Liu, C., Liu, J., Wu, X., Zhang, Y. (2007) Separation and purification of triclin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 55(25), 10086-10092.
- Johann, S., de Oliveira, V.L., Pizzolatti, M.G., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Branco, A., Smania Jr, A. (2007) Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro*, 102(6), 681-685.

- Kang, S.I., Kim, M.H., Shin, H.S., Kim, H.M., Hong, Y.S., Park, J.G., Ko, H.C., Lee, N.H., Chung, W.S., Kim, S.J. (2010) A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J. Nut. Biochem.*, Available online 23 March.
- Kang, S.I., Jin, Y.J., Ko, H.C., Choi, S.Y., Hwang, J.H., Whang, I.S., Kim, M.H., Shin, H.S., Jeong, H.B., Kim, S.J. (2008) *Petalonia* improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 373(2), 265-269.
- Kang, S.K., Choi, Y.H., An, H.J., Yun, S.H., Kim, H.Y., Jung, S.K., Lee, C.H. (2000) Flavonoids in citrus species native to Cheju island. *원예과학기술지*, 18(1), 210.
- Katoh, T., Ehara, T. (1990) Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fascia*. Electron microscopic studies. *Plant and Cell Physiology*, 31(4), 439-447.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito, C., Furukawa, H. (2000) Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. *J. Agric. Food Chem.*, 48(9), 3865-3871.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell line. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 63(5), 896-899.
- Katiyar, S.K., Matsui, M.S., Elmets, C.A., Mukhtar, H. (2008) Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-

induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 69(2), 148-153.

Kim, B.H., Lee, J. Shen, T., Kim, J.D., Cho, J.Y. (2010) Anti-inflammatory activity of hot water extract of *Berberis koreana* in lipopoly saccharide-induced macrophage-like cells. *J. Med. Plants. Res.*, 4(9), 745-752.

Kim, H., Ralph, J., Lu, F., Ralph, S.A., Boudet, A.M., Mackay, J.J., Sederoff, R.R., Ito, T., Kawai, S., Ohashi, H., Higuchi, T. (2003) NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxy cinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins. *Org. Biomol. Chem.*, 1(2), 268-281.

Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Kim, H.P. (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.*, 58(5), 759-765.

Kitamura, K., Kawahara, T. (2009) Clonal identification by microsatellite loci in sporadic flowering of a dwarf bamboo species, *Sasa cernua*. *Journal of plant Research*, 122(3), 299-304.

Ko, H.C., Jang, M.K., Kang, C.H., Lee, N.H., Kang, S.I., Lee, S.L., Park, D.B., Kim, S.J. (2010) Preparation of a polymethoxyflavone-rich fraction (PRF) of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka and its antiproliferative effects. *Food Chem.*, 123(2), 484-488.

Kobayashi, S., Tanabe, S. (2006) Evaluation of the anti-allergic activity of



Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. *Int. J. Mol. Med.*, 17(3), 511-515.

Kroyer, G. (1986) Uber die antioxidative Aktivitat von Zitrusfruchtschalen (Antioxidant activity of citrus peels). *Zeitschrift fur Ernahrungswiss*, 25, 63-69.

Kuda, T., Hishi, T., Maekawa, S. (2006) Antioxidant properties of dried product of 'haba-nori', and edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova. *Food Chem.*, 98(3), 545-550.

Kuhnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 24(1), 117-191.

Kurosumi, A., Sasaki, C., Kumada, K., Kobayashi, F., Mtui, G., Nakamura, Y. (2007) Novel extraction method of antioxidant compounds from *Sasa palmata* (Bean) Nakai using steam explosion. *Process Biochemistry*, 42(10), 1449-1453.

Kwok, B.H.B., Koh, B., Ndubuisi, M.I., Elofsson, M., Crews, C.M. (2001) The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits ikB kinase. *Chemistry & Biology*, 8(8), 759-766.

Kwon, C.S., Kwon, Y.S., Kim, Y.S., Kwon, G.S., Jin, I., Ryu, G.C., Sohn, H.Y. (2004) Inhibitory activities of edible and medicinal herbs against human thrombin. *J. Life Sci.*, 14(3), 509-513.

- Kwon, Y.S., Kim, C.M. (2003) Antioxidant constituents from the stem of *Sorghum bicolor*. *Arch. Pharm. Res.*, 26(7), 535-539.
- Lai, C.S., Li S., Chai, C.Y., Lo, C.Y., Dushenkov, S., Ho, C.T., Pan, M.H., Wang, Y.J. (2008) Anti-inflammatory and antitumor promotional effects of a novel urinary metabolite, 3'4'-didemethylnobiletin, derived from nobiletin. *Carcinogenesis*, 29(2), 2415-2424.
- Lee, I.K., Kim, Y.S., Jang, Y.W., Jung, J.Y., Yun, B.S. (2007) New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(24), 6678-6681.
- Lee, J., Jeong, Y. H., Jang, D. S., Seo, E. K. (2007). Three terpenes and one phenolic compound from *Sasa borealis*. *J. Appl. Biol. Chem.* 50(1), 13-16.
- Lee, S.I., An, S.M., Mun, G.I., Lee, S.J., Park, K.M., Park, S.H., Boo, Y.C. (2008) Protective effect of *Sasa quelpaertensis* and p-coumaric acid on ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Biol. Chem.*, 51(4), 148-154.
- Lee, S.Y., Kim, S.M., Hwang, E.J. (2005) Multidrug-resistance reversing activity of the local Citrus fruits in Jeju island, Korea. *한국자원식물학회지*, 18(1), 41-51.
- Letelier, M.E., Molina-Berrios, A.M., Cortes-Troncoso, J., Jara-Sandoval, J., Holst, M., Palma, K., Montoya, M. (2008) DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 279-286.
- Li, R.W., Theriault, A.G., Au, K., Douglas, T.D., Casaschi, A., Kurowska, E.M., Mukherjee, R. (2006) Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and

glucose homeostasis and modulated adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sci.*, 79(4), 365-373.

- Li, S., Lambros, T., Wang, Z., Goodnow, R., Ho, C.C. (2007) Efficient and scalable method in isolation of polymethoxyflavones from orange peel extract by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography*, 846(1-2), 291-297.
- Li, S., Lo, C.Y., Ho, C.T. (2006) Hydroxylated polymethoxyflavone and methylated flavonoids in sweet orange(*Citrus sinensis*) Peel. *J. Agric. Food Chem.*, 54(12), 4176-4185.
- Li, S., Pan, M.H., Lai, C.S., Lo, C.Y., Dushenkov, S., Ho, C.T. (2007) Isolation and synthesis of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxy flavones as inhibitor of HL-60 cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(10), 3381-3389.
- Li, S., Yu, H., Ho, C.T. (2006) Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed. Chromatogr.*, 20(1), 133-138.
- Lin, N, Sato, T., Takayama, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M., Ito, A. (2003) Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem. Pharm.* 65(12), 2065-2071.
- Lim, J.H., Park, H.S., Choi, J.K., Lee, I.S., Choi, H.J. (2007) Isoorientin induces Nrf2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Arch. Pharm. Res.* 30(12), 1590-1598.

- Lu, B., Wu, X., Tie, X., Zhang, Y., Zhang, Y. (2005) Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food Chem. Toxicol.*, 43(5), 783-792.
- Machida, K., Osawa, K. (1989) On the flavonoid constituents from the peels of *Citrus hassaku* HORT. ex TANAKA. *Chem. Pharm. Bull.*, 37(4), 1092-1094.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K. (2005) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effecto through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332(2), 392-397.
- Makita, A. (1992) Survivorship of a monocarpic bamboo grass, *Sasa kurilensis*, during the early regeneration process after mass flowering. *Ecological Research*, 7(3), 245-254.
- Malikov, V.M., Yuldashev, M.P. (2002) Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. Genus. distribution, structure, and properities. *Chemistry of Natural Compounds*, 38(4), 358-406.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Saija, A., Dugh, G., Lo Curto, R.B., Faulds, C.B., Waldronll, II. Waldronll, K.W. (2006) Characterization of flavonoids and pectins from bergemot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 54(1), 197-203.
- Manthey, J.A., Grohmann, K. (2001) Phenols in citrus peel byproducts. Concentation of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in

citrus peel molasses. *J. Agric. Food Chem.*, 49(7), 3268-3273.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N. (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74(2), 105-112.

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, T., Takeuchi, M., Chihara, Y., Yamamoto, Y., Niki, E., Karube, I. (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 9(1), 29-35.

Miyata, Y., Sato, T., Imada, K., Dobashi, A., Yano, M., Ito, A. (2008) A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366(1), 168-173.

Mizobuchi, S., Sato, Y. (1984) A new flavanone with antifungal activity isolated from Hops. *Agric. Biol. Chem.*, 48(11), 2771-2775.

Mizushima, Y., Sugiyama, Y., Yoshida, H., Hanashima, S., Yamazaki, T., Kamisuki, S., Ohta, K., Takemura, M., Yamaguchi, T., Matsukage, A., Yoshida, S., Saneyoshi, M., Sugawara, F., Sakagauchi, K. (2001) Galactosyldiacylglycerol, a Mammalian DNA polymerase  $\alpha$ -specific inhibitor from a sea alga, *Petalonia binghamiae*. *Biol. Pharm. Bull.*, 24(9), 982-987.

Mori, K., Ooi, T., Hiraoka, M., Oka, N., Hamada, H., Tamura, M., Kusumi, T. (2004) Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in

deep seawater. *Marin Drugs*, 2(2), 63-67.

Murakami, C., Takemura, M., Sugiyama, Y., Kamisuki, S., Asahara, H., Kawasaki, M., Ishidoh, H., Sakaguchi, K., Mizushina, Y. (2002) Vitamin A-related compounds, all-trans retinal and retinoic acids, selectively inhibit activities of mammalian replicative DNA polymerases. *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, 1574(1), 85-92.

Nakajima, Y., Young, S. Y., Kunugi, A. (2003). Six new flavonolignans from *Sasa veitchii* Rehder. *Tetrahedron*, 59(40), 8011-8015.

Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6(12), 3051-3064.

Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H. (2006) Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(1), 178-192.

Numata, M. (1970) Conservation implications of bamboo flowering and death in Japan. *Biol. Conserv.* 2, 227-229.

Okuzumi, J., Nishino, H., Murakoshi, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., Yamane, T., Fujita, Y., Takahashi, T. (1990) Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Letters*. 55(1), 75-81.

Pan, M.H., Chen, W.J., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K. (2002) Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in

human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 23(10), 1677-1684.

Pan, M.H., Lai, Y.S., Lai, C.S., Wang, Y.J., Li, S., Lo, C.Y., Dushenkov, S., Ho, C.T. (2007) 5-Hydroxy-3,6,7,8,3'4'-hexamethoxyflavone induces apoptosis through reactive oxygen species production, expression, and caspase activation in human leukemia cells. *J. Agric. Food Chem.*, 55(13), 5081-5091.

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. (1990) Natural antioxidants not exploited commercially. In B.J.F. (Ed.). *Food Antioxidants Hudson*, pp. 171-192.

Park, H. S., Lim, J. H., Kim, H. J., Choi, H. J., Lee, I. S. (2007). Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Arch. Pharm. Res.*, 30(2), 161-166.

Qizhen, D., Chen, H. (2010) The methoxyflavones in *Citrus reticulata Blanco cv. ponkan* and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food Chem.*, 119(2), 567-572.

Raman, G., Jayaprakasha, G.K., Cho, M., Brodbelt, J., Patil B.S. (2005) Rapid adsorptive separation of citrus polymethoxylated flavones in non-aqueous conditions. *Separation and Purification Technology*, 45(2), 147-152.

Ren, M., Reilly, R.T., Sacchi, N. (2004) *Sasa* Health extract a protective effect on Her2/NeuN mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.*, 24(5A), 2879-2884.

Rhew, K.S., Boo, S.M. (1991) Morphological variability in *Enderachne binghamiae* J. Agardh(Phaeophyta) from the east coast of Korea. *J. Bot.*, 34(1), 45-51.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995) The Relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(4), 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956.
- Ripple, M.O., Henry, W.F., Pago, R.P., Wilding, G. (1997) Prooxidant-Antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89(1), 40-48.
- Rump, A.F., Schussler, M., Acar, D., Cordes, A., Ratke, R., Theisohn, M., Rosen, R., Klaus, W, Fricke, U. (1995) Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen. Pharmacol.* 26(3), 603-611.
- Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y., Kim, Y.K. (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytotherapy Research*, 17(5), 485-489.
- Sakai, A., Watanabe, K., Koketsu, M., Akuzawa, K., Yamada, R., Li, Z., Sadanari, H., Matsubara, K., Murayama, T. (2008). Anti-human cytomegalovirus activity of constituents from *Sasa albo-marginata* (Kumazasa in Japan). *Antivir. Chem. Chemother*, 19(3), 125-132.
- Sato, T., Takahashi, A., Kojima, M., Akimoto, N., Yano, M., Ito, A. (2007) A citrus polymethoxy flavonoid, nobiletin inhibits sebum production and sebocyte proliferation, and augments sebum excretion in hamsters. *J.*



*Invest. Dermatol.*, 127(12), 2740-2748.

Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P., Lopez-Cervantes, J. (2004) An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography*, 18(3), 183-190.

Satoh, Y., Tashiro, S., Satoh, M., Fujimoto, Y., Xu, J.Y., Ikekawa, T. (1996) Studies on the bioactive constituents of *Aurantii frctus immaturus*. *Yakugaku Zasshi*, 116(3), 244-250.

Schapoval, E.E.S., Winter de Vargas, M.R. Chaves, C.G., B730f, R., Zuanazzi, J.A., Henriques, A.T. (1998) Antiinflammatory and antinociceptive acitivities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *J. Ethnopharmacol.*, 60(1), 53-59.

Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*. 36(2), 177-187.

Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.

Siess, M.H., Le Bon, A.M., Canivenc- Lavier, M.C., Suschetet, M. (2000) Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors*, 12(1-4), 193-199.

Stuehr H.H., Kwon, N.S., Weise, M., Nathan, C. (1991) Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: and FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proceeding of the national academy of Sciences of the*

*United States of America*. 88(17), 7773-7777.

Sultana, N., Lee, N. H. (2009) New phenylpropanoids from *Sasa queipaertensis* Nakai with tyrosinase inhibition activities. *Bull. Koeran Chem. Soc.*, 30(8), 1729-1732.

Sultana, N., Lee, N. H. (2010) A new alkene glycoside from the leaves of *Sasa queipaertensis* Nakai. *Bull. Koeran Chem. Soc.*, 31(4), 1088-1090.

Takano, R., Iwane-Sakata, H., Hayashi, K., Hara, S., Hirase, S. (1998) Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et ruprecht(cryptonemiales, rhodophyta). *Carbohydrate Polymers*, 35(1-2), 81-87.

Tanaka, N., Wada, H., Fuchino, H., Inoue, Y., Yasuda, D., kanda, S., kiyokawa, C., Ashida, N., Suzuki, T., Yamazaki, K., Hakamatsuak, N. (1988) constituent of bamboos and bamboo grasses. *Yakugaku zasshi*, 118(8), 332-337.

Terao, J., Piskula, M., Yao, Q. (1994) Protective effect of epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 308(1), 278-284.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compost. Anal.*, 19(6-7), 669-675.

Tracey, K.J. (2002) The inflammatory reflex. *Nature*. 420(6971), 853-859.

- Tripoli, E., Guardia, M.L., Giammanco, S., Majo, D.D., Giammanco, M. (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.
- Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V. (2006) The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 7(1-2), 140-146.
- Tzeng, S.H., Ko, W.C., Ko, F.N., Teng, C.M. (1991) Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.*, 64(1), 91-100.
- Uddin, S. (1990) Studies on the chemical constituents of the fruit of *guaiacum officinale* linn. And some marine organisms. H.E.J. Research Institute of Chemistry University of Karachi, p134.
- Wang, Z., Li, S., Ferguson, S., Goodnow, R., Ho, C.T. (2008) Validated reversed phase LC method for quantitative analysis of polymethoxy flavones in citrus peel extracts. *J. Sep. Sci.*, 31(1), 30-37.
- Wilmsen, P.K., Spada, D.S., Sul, C., Sul, C., Brazil, R.S. (2005) Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.*, 53(12), 4757-4761.
- Wu, Y.Q., Zhou, C.H., Tao, J., Li, S.N. (2006) Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. *Life Sci.*, 78(23), 2689-2696.
- Xia, B., Abbott, I.A. (1987) Edible seaweeds of china and their place in the

chinese diet. *Econ. Bot.*, 41(3), 341-353.

Yan, X., Nagata, T., Fan, X. (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 253-262.

Yanez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Canteras, M., Teruel, J.A. (2004) Cytotoxicity and antiproliferative activity of several phenolic compounds against three melanocytes cell line: relationship between structure and activity. *Nutr. Cancer*, 49(2), 191-199.

Yang, J.H., Lim, H.S., Heo, Y.R. (2010) *Sasa borealis* leaves extract improves insulin resistance by modulating inflammatory cytokine secretion in high fat diet-induced obese C57/BL6J mice. *Nurt. Res. Pract.* 4(2), 99-105.

Yang, J.L., Jang, J.H., Radliakrishnan, V., Kim, Y.H., Song, Y.S. (2008)  $\beta$ -Glucan suppresses LPS-stimulated NO production through the down-regulation of iNOS expression and NF-kappaB transactivation in raw 264.7 macrophages. *Food Science and Biotechnology*. 17(1), 106-113.

Yao, K., Zhang, L., Zhang, Y., Ye, P., Zhu, N. (2008) The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF-kB and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Molecular Vision* 2008, 14, 1865-1871.

Yoshida, (1998) Marine algae of Japan. 内田老 鶴圃 p 308-309.

Yoshimizu, N., Otani, Y., Saikawa, Y., Kubota, T., Yoshida, M., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Fujiis, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A., Kitajima, M. (2004) Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric

cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 20(1), 95-101.

Yu, J., Wang, L., Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M., Patil, B.S. (2005) Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2009-2014.

Yumiko, Y.S., Ya-pei, H., Takeshi, S. (2003) Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J Tokyo Univ. Fish.*, 89, 1-6

Yusof, S., Mohd Ghazali, H., Swee King G. (1990) Naringin content in local citrus fruits. *Food chemistry*, 37(2), 113-121.

Zhao, X.W., Li, J.X., Zhu, Z.R., Sun, D.Q., Liu, S.C. (1989) Anti-shock effects of synthetic effective compositions of fructus aurantii immaturus. Experimental study and clinical observation. *Chin. Med. J.*, 102(2), 91-93.

Zhou, D.Y., Chen, D.L., Xu, Q., Xue, X.Y., Zhang, F.F., Liang, X.M. (2007) Characterization of polymethoxylated flavones in Fructus aurantii by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization combined with tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49(5), 1692-1699.